



# Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives : mise en place et évaluation d'une méthode de PCR en temps réel au CHU de Grenoble

David Rossignol

## ► To cite this version:

David Rossignol. Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives : mise en place et évaluation d'une méthode de PCR en temps réel au CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00933158

**HAL Id: dumas-00933158**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00933158>**

Submitted on 20 Jan 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives :  
mise en place et évaluation d'une méthode de PCR  
en temps réel au CHU de Grenoble**

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

David ROSSIGNOL

Né le 22 septembre 1987 à Maisons-Alfort

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Pharmacie de Grenoble\*

Le 19 décembre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Présidente du jury : Madame le Professeur Muriel CORNET

Directrice de thèse : Madame le Professeur Muriel CORNET

Membres :

Madame le Docteur Anne THIEBAUT-BERTRAND

Monsieur le Docteur Olivier EPAULARD

Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX

*\* La faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

**Année 2013-2014**

### ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

#### PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=12)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

#### PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

#### PROFESSEURS EMERITES (n=2)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



### MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

BEDOUC	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C./MCU-PH)

### PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

### PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

### PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=3)

CHANOINE	Sébastien	Pharmacie Clinique (UF-CHU)
GARNAUD	Cécile	Parasitologie-Mycologie
VAN NOLLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DNTP-BGM)

### MEDAILLE D'OR D'ANNE D'INTERNAT SUPPLEMENTAIRE (n=2)

BERNARD	Delphine	période de 6 mois – novembre 2013 à avril 2014
GAUTIER	Elodie	période de 6 mois – mai 2014 à novembre 2014

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



### ATER (n= 3)

BRAULT Julie	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
GRAS Emmanuelle	ATER	Physiologie-Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)

### MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS

BEL	Coraline	(01-10-2012 au 30-09-2014)	
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
BOSSON	Anthony	(01-10-2013 au 30-09-2015)	Laboratoire GIN
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
CHRISTEN	Aude	(01-10-2013 au 30-09-2015)	DCM
CRESPO	Xenia	(01-10-2013 au 30-09-2015)	LBGE
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Pharmacochimie (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-11-2011 au 31/10-2014)	Laboratoire HP2(JR)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2(JR)
OUIDIR	Marion	(01-10-2011 au 30-09-2014)	
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

### Professeur Invité

NURISSE	Alessandra	(01/11/13 au 31/12/2013))
---------	------------	---------------------------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse et Ontogénèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 02/10/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 76 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

# **Remerciements**

## **A Madame le Professeur Muriel Cornet,**

Pour avoir accepté la présidence de ce jury, m'avoir confié et avoir encadré ce travail de thèse. Merci pour votre disponibilité, votre rigueur, votre sympathie et pour les connaissances que vous m'avez transmises au cours de ce travail et également au cours de mon stage de Parasitologie-Mycologie. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère sympathie et de mon profond respect.

## **A Madame le Docteur Anne Thiébaut-Bertrand,**

Pour avoir accepté de juger ce travail en tant que clinicien. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

## **A Monsieur le Docteur Olivier Epaulard,**

Pour avoir accepté de juger ce travail en tant que clinicien. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

## **A Monsieur le Professeur Hervé Pelloux,**

Pour avoir accepté de juger ce travail en tant que spécialiste, pour m'avoir accueilli dans votre service au cours de mon internat et pour avoir soutenu ce projet. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère sympathie et de mon profond respect.

## **A l'ensemble des biologistes médicaux de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble:** Odile, Marie-Pierre, Hélène, Claudine, Danièle, Jean-Benjamin et ceux déjà cités,

Pour votre implication quotidienne dans la formation des internes et pour le soutien que vous m'avez apporté au cours de ce travail de thèse.

## **A toutes les personnes qui ont également participé à ce projet, en particulier :**

A Nicolas, pour avoir initié ce projet conjointement avec Muriel

A Elodie et Lysiane, pour avoir mené avec brio l'étude prospective

Aux technicien(ne)s du laboratoire Parasitologie-Mycologie, en particulier Valérie, pour avoir aidé à la mise en place de cette méthode.



**A l'ensemble des biologistes médicaux et des technicien(ne)s qui participent et ont participé à ma formation au cours de mon internat**, en particulier :

Les biologistes médicaux du laboratoire des Eaux Claires (merci Jean-Christophe et à son équipe), Chantal, Claire, Christine, Monique, Isabelle, Sylvie, Isabelle, Jacques, Patrice, Benoît, John, Pierre, Raphaël, Julien, Catherine, Martine, Max, et tous les autres que j'oublie à l'instant.

**A l'ensemble mes co-internes**, avec qui je partage tant de moments formidables et qui savent si bien me supporter, en particulier :

Alice, Céline, Elise Boiteux, Elise Baron, Elodie, Pauline, Alexandre et Julien : nous sommes une promotion unie. Merci pour tous les bons moments passés en stage et en dehors, votre soutien, votre amitié, et tout ce qui reste à venir.

Aurélie, Caroline et Elena : merci pour votre soutien très important au cours de ce travail de thèse.

**A mes amis**, en particulier :

Rémi, Anne-Laure, Charlotte, Hortense, Stéphanie, Isabelle, Thomas, Grégory.

**A ma famille**, en particulier :

A mes grands-parents.

A mes parents, pour leur soutien affectif et logistique depuis le début de ces longues études, merci d'être encore présents et de m'avoir transmis votre amour, vos passions et certaines de vos valeurs. Soyez assurés de mon amour.

A mon frère Stéphane, j'espère que tu as trouvé ton bonheur en Irlande auprès de Clotilde, merci pour ton soutien et pour ta réussite qui me sert de modèle. Soit assuré de mon amour.

**A la famille de Mathilde**, en particulier :

A Jean-Paul et Yvette.

A Perrine et Pierre-Yves.

A Annette et Guy.

**A Sylvain,**

Pour notre soutien mutuel au cours de notre internat, nos innombrables et mémorables sorties de ski dans la poudreuse, nos dérapages sous la neige, nos sorties vélos et VTT, nos combats, nos joies, nos peines. Pour tout ce que tu m'as appris également. Merci mon ami.

**A Florian,**

Pour ta façon d'être, ton talent, ton humour, ton soutien et ta capacité à me rappeler qu'il y a plus important que tout ce qui nous entoure. Notre communion de pensée peut nous mener très loin, continuons notre chemin musical et amical ensemble le plus longtemps possible.

**A Mathilde,**

Pour ces 7 ans passés ensemble,

Pour ta réussite qui me donne tant de satisfactions,

Pour ton caractère, pour ton amour, ton soutien indéfectible, ta tendresse, ta compréhension, ta motivation, ta joie de vivre, ta tolérance,

Pour ce que tu m'as déjà offert et ce que tu m'offriras encore. J'espère que notre histoire n'en est qu'à son aube et que le plus beau reste à venir.

Soit évidemment assurée de mon amour pour toi.

**A tous ceux que j'oublie,** n'hésitez pas à vous manifester.

# Sommaire

<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>13</b>
---	-----------

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>15</b>
-------------------------------------	-----------

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
--------------------------	-----------

<b>RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ASPERGILLOSE INVASIVE... 18</b>	
---	--

<b>1. AGENTS RESPONSABLES.....</b>	<b>18</b>
------------------------------------	-----------

1.1. Généralités.....	18
1.2. Historique .....	19
1.3. Classification .....	20
1.4. Morphologie .....	20
1.4.1. Macroscopique .....	20
1.4.2. Microscopique.....	21
1.4.3. Diagnostic d'espèce.....	21
1.4.4. Caractéristiques des espèces responsables d'aspergilloses invasives .....	22
1.4.5. Fréquences d'isolement.....	25

<b>2. PHYSIOPATHOLOGIE.....</b>	<b>25</b>
---------------------------------	-----------

2.1. Facteurs de virulence d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	25
2.1.1. Structure du champignon : paroi .....	26
2.1.2. Capacité d'adaptation et de croissance en situation de stress .....	28
2.1.2.1. Thermotolérance .....	28
2.1.2.2. Adaptations nutritionnelles chez l'hôte en situation invasive .....	28
2.1.2.3. Adaptations métaboliques en situation de stress .....	28
2.1.3. Mise en place de systèmes d'échappement au système immunitaire .....	29
2.1.3.1. Les conidies et la paroi .....	29
2.1.3.2. La mélanine et les hydrophobines.....	29
2.1.3.3. Equipement enzymatique du champignon .....	30
2.1.4. Capacité de causer des dommages à l'hôte : toxines .....	30
2.1.5. Sa capacité d'invasion.....	31
2.1.6. Formation de biofilms .....	31
2.1.7. Propriétés allergisantes.....	31

2.2. Mécanismes de défense immunitaire contre <i>Aspergillus fumigatus</i> chez l'immunocompétent.....	31
--	----

2.2.1. Immunité innée.....	31
2.2.1.1. Généralités.....	31
2.2.1.2. Cellules de l'immunité innée .....	33
2.2.1.2.1. Macrophages alvéolaires .....	33

2.2.1.2.2.	Polynucléaires neutrophiles recrutés.....	33
2.2.1.2.3.	Cellules natural-killer (NK).....	34
2.2.1.3.	Récepteurs solubles .....	35
2.2.1.3.1.	Protéines surfactantes A et D.....	35
2.2.1.3.2.	Pentraxine-3.....	35
2.2.1.4.	Récepteurs liés aux cellules .....	35
2.2.1.4.1.	TLR .....	35
2.2.1.4.2.	Dectine-1 .....	35
2.2.1.5.	Cytokines impliquées dans la transmission des signaux .....	35
2.2.2.	Immunité adaptative : réponse cellulaire .....	36
2.2.2.1.	Lymphocytes T .....	36
2.2.2.2.	Lymphocytes B .....	36
2.3.	Histoire naturelle de l'AI.....	36
2.3.1.	Atteinte pulmonaire.....	36
2.3.2.	Restauration immunitaire et syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire .....	37
2.3.3.	Dissémination et localisations secondaires.....	38
<b>3.</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>38</b>
3.1.	Patients à risque dans la population adulte .....	38
3.1.1.	Pathologies hématologiques .....	39
3.1.1.1.	Cancers hématologiques .....	39
3.1.1.2.	Greffes de cellules souches .....	39
3.1.2.	Transplantations d'organes solides.....	40
3.1.3.	Maladies pulmonaires chroniques .....	40
3.2.	Facteurs de risque dans la population pédiatrique.....	41
3.2.1.	Granulomatose septique chronique.....	41
3.3.	Facteurs de risque récemment identifiés .....	41
3.3.1.	Infection par la grippe H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> .....	41
3.3.2.	Prédispositions génétiques.....	41
<b>4.</b>	<b>PRESENTATIONS CLINIQUES, PRONOSTIC, PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT.....</b>	<b>42</b>
4.1.	Aspects cliniques .....	42
4.1.1.	Aspergilloses invasives en hématologie .....	42
4.1.1.1.	API angioinvasive.....	42
4.1.1.2.	API bronchoinvasive .....	43
4.1.2.	Aspergillose trachéobronchique .....	43
4.1.3.	Aspergillose sinusienne invasive.....	43
4.1.4.	Autres formes cliniques.....	43
4.2.	Pronostic .....	44
4.3.	Prophylaxie et traitement curatif .....	45
4.3.1.	Traitement .....	45
4.3.1.1.	Médicamenteux .....	45
4.3.1.1.1.	Durée du traitement .....	45
4.3.1.1.2.	Première intention .....	45
4.3.1.1.3.	Sauvetage.....	45

4.3.1.1.4.	Associations.....	46
4.3.1.1.5.	Résistances aux triazolés chez <i>A. fumigatus</i> .....	46
4.3.1.2.	Non médicamenteux .....	46
4.3.2.	Prophylaxie des AI en hématologie.....	47
4.3.2.1.	Médicamenteuse .....	47
4.3.2.2.	Non médicamenteuse.....	47
<b>5.</b>	<b>DIAGNOSTIC DES ASPERGILLOSES INVASIVES.....</b>	<b>47</b>
5.1.	Critères de classification.....	47
5.2.	Diagnostic radiologique.....	48
5.2.1.	Forme angioinvasive .....	48
5.2.1.1.	Signe du halo .....	48
5.2.1.2.	Signe du croissant gazeux.....	49
5.2.2.	Forme bronchoinvasive .....	50
5.3.	Diagnostic biologique.....	51
5.3.1.	Culture et microscopie.....	51
5.3.1.1.	Sur le sérum ou le sang total .....	51
5.3.1.2.	Sur les prélèvements respiratoires.....	51
5.3.1.3.	Sur le liquide céphalo-rachidien .....	52
5.3.1.4.	Conclusion.....	52
5.3.2.	Histologie .....	53
5.3.2.1.	Principe.....	53
5.3.2.2.	Conclusion.....	53
5.3.3.	Antigène galactomannane .....	54
5.3.3.1.	Sur le sérum.....	54
5.3.3.1.1.	Cinétique .....	54
5.3.3.1.2.	Apport diagnostique .....	54
5.3.3.1.3.	Apport pronostique.....	55
5.3.3.1.4.	Limites.....	55
5.3.3.2.	Sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire.....	58
5.3.3.3.	Sur le liquide céphalo-rachidien .....	58
5.3.4.	Antigène (1→3)-β-D-glucane .....	58
5.3.4.1.	Généralités.....	58
5.3.4.2.	Cinétique.....	59
5.3.4.3.	Faux positifs .....	59
5.3.4.4.	Apport diagnostique.....	59
5.3.5.	Antigène glycoprotéine extracellulaire.....	59
<b>6.</b>	<b>APPORT DES TECHNIQUES MOLECULAIRES.....</b>	<b>60</b>
6.1.	Principe.....	60
6.1.1.	Génome d' <i>Aspergillus fumigatus</i> et cibles potentielles .....	61
6.1.2.	Différentes techniques d'analyse.....	61
6.2.	Sur un prélèvement sanguin .....	62
6.2.1.	Choix de l'échantillon .....	62
6.2.2.	Stabilité .....	63

6.2.3. Cinétique .....	63
6.2.4. Apport diagnostique .....	63
6.2.5. Apport pronostique.....	64
6.2.6. Faux positifs .....	64
6.3. Sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire .....	65
6.4. Sur le liquide céphalo-rachidien .....	66
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>68</b>
1. CHOIX DU PRELEVEMENT ET DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION.....	68
2. CHOIX DE LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION ET DE LA CIBLE .....	68
3. MISE AU POINT DE LA METHODE .....	70
4. REDACTION DES PROCEDURES ET FORMATION DES TECHNICIENS.....	72
5. INTERPRETATION D'UN RESULTAT POSITIF .....	72
6. INTERPRETATION D'UN RESULTAT NEGATIF .....	74
7. ETUDE RETROSPECTIVE.....	74
8. ETUDE PROSPECTIVE .....	74
9. ANALYSE DES RESULTATS.....	75
<b>RESULTATS .....</b>	<b>76</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>92</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>110</b>

# Liste des tableaux et figures

## Liste des tableaux

Tableau I : principaux caractères macroscopiques et microscopiques des <i>Aspergillus</i> spp. responsables d'AI.....	24
Tableau II : performances de l'antigénémie GM selon les populations étudiées .....	56
Tableau III : récapitulatif des principales cibles utilisées pour la PCR <i>Aspergillus</i> spp.....	61
Tableau IV : résumé des performances de la PCR selon la classification EORTC de l'AI .....	77
Tableau V : résumé des performances de la combinaison GM/PCR .....	78
Tableau VI: résultats de la PCR chez les patients atteints d'AI au cours des études prospective et rétrospective. ....	80
Tableau VII : résultats de la PCR chez les patients indemnes d'AI et présentant une ou plusieurs antigénémies GM positives au cours des études prospective et rétrospective.....	81
Tableau VIII : résultats positifs de PCR chez les patients indemnes d'AI et négatifs en antigénémie GM au cours des études prospective et rétrospective .....	82
Tableau IX : pertinence des études rétrospective et prospective réalisées.....	84

## Liste des figures

Figure 1 : différentes formes cliniques d'aspergilloses selon la réponse immunitaire et la gravité de la pathologie .....	16
Figure 2 : représentation de l'appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> spp. ....	18
Figure 3 : photo d'un <i>aspergillum</i> .....	19
Figure 4 : représentation d' <i>A. fumigatus</i> par Fresenius .....	20
Figure 5 : aspects macroscopiques et microscopiques des principales espèces d' <i>Aspergillus</i> spp. retrouvées au cours des AI.....	23
Figure 6 : structure de la paroi d' <i>A. fumigatus</i> .....	27
Figure 7 : représentation de l'immunité innée anti-aspergillaire après l'inhalation de spores d' <i>Aspergillus</i> spp. ....	32
Figure 8 : NETosis d'un PNN après un contact avec <i>A. fumigatus</i> .....	34
Figure 9 : représentation de la réponse innée anti-aspergillaire au début d'une AI .....	37
Figure 10 : signe du halo chez un patient de 58 ans souffrant d'une API dans un contexte de LAM .....	48
Figure 11 : signe du croissant gazeux chez le même patient, 4 jours après le signe du halo ...	50
Figure 12 : arbres en bourgeons au scanner thoracique .....	50
Figure 13 : mise en évidence de filaments d' <i>Aspergillus</i> spp. sur une biopsie tissulaire (coloration de Gomori).....	53
Figure 14 : exemples de résultats du test immuno-chromatographique spécifique d' <i>Aspergillus</i> spp. ....	60
Figure 15 : principe de l'extraction d'ADN sur le MagNA Pure (Roche Diagnostics) .....	68
Figure 16 : principe de fonctionnement d'une détection par sonde d'hydrolyse .....	69
Figure 17 : représentation d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel.....	70
Figure 18 : optimisation de la concentration en $MgCl_2$ .....	71
Figure 19 : résultats de PCR positifs au cours de la mise au point .....	73
Figure 20 : exemple de stratégie de diagnostic des AI chez des patients d'hématologie .....	88



## **Liste des abréviations**

AI: aspergillose invasive

API: aspergillose pulmonaire invasive

BG : (1→3)-β-D-glucane

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

CI : contrôle interne

DICS : déficit immunitaire combiné sévère

GM : galactomannane

GVHD : graft versus host disease : maladie du greffon contre l'hôte

HIF-1: hypoxemia induced factor 1

IFI : infection fongique invasive

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LCR : liquide céphalo-rachidien

MAP : mitogen activated protein

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NET: neutrophil extracellular trap

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PCR : polymerase chain reaction

PNN : polynucléaire neutrophile

ROS : reactive oxygen species : espèces réactives de l'oxygène

TLR : toll-like receptor

TNF-α : tumor necrosis factor alpha

VPN : valeur prédictive négative

VPP : valeur prédictive positive

# Introduction

Les *Aspergillus* spp. sont des champignons omniprésents dans notre environnement quotidien. Bien qu'ils n'engendrent que rarement des pathologies chez l'Homme, celles-ci présentent un spectre clinique très varié et dépendant du terrain sur lequel elles se développent : ce sont les aspergilloses. Les aspergilloses peuvent ainsi être classées en 3 grandes catégories représentées en figure 1 :

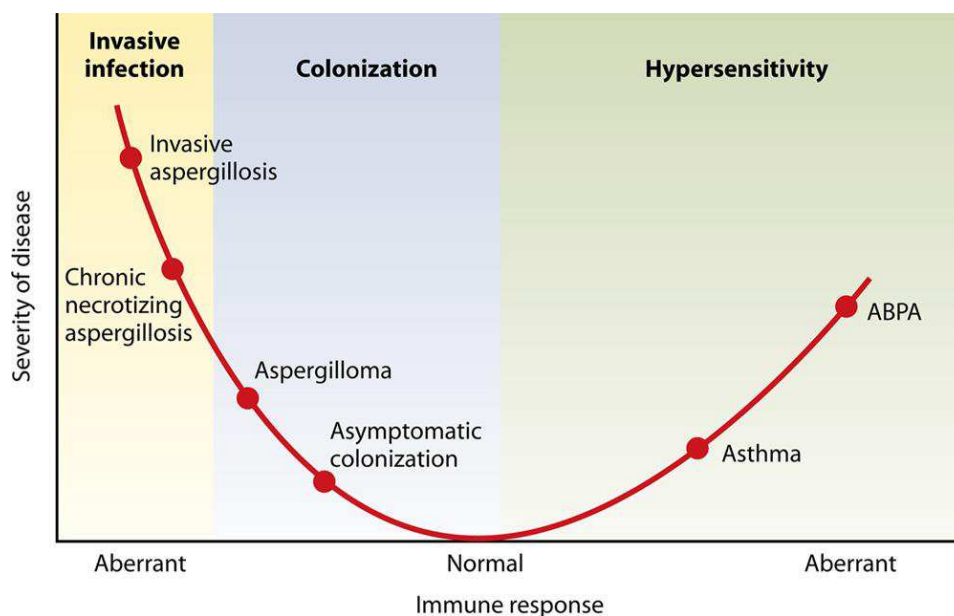


Figure 1 : différentes formes cliniques d'aspergilloses selon la réponse immunitaire et la gravité de la pathologie (d'après (1))

- les formes chroniques (aspergillomes, aspergilloses chroniques nécrosantes, cavitaires ou fibrosantes) (2) (3) : ces situations se rencontrent sur des terrains où l'immunité est normale ou légèrement altérée ; l'évolution clinique est prolongée,
- les formes allergiques (aspergillose broncho-pulmonaire allergique) : cette allergie est la traduction d'une réaction d'hypersensibilité suite à une exposition à l'*Aspergillus* sp.,
- les formes invasives (aspergilloses pulmonaires invasives, aspergilloses trachéobronchiques, aspergilloses sinusiennes invasives) : ces situations se rencontrent sur des terrains fortement immunodéprimés ; le champignon s'y développe et peut disséminer dans tout l'organisme avec des conséquences importantes sur le plan clinique. Le taux de mortalité reste élevé malgré le traitement. Ces difficultés sont liées en partie à un diagnostic incertain et souvent trop tardif.

En effet, peu d'outils sont à la disposition du clinicien lui permettant d'initier au plus vite un traitement adapté : les signes radiologiques manquent de spécificité et les examens histologiques sont invasifs et souvent contre-indiqués.

Le diagnostic biologique de l'aspergillose invasive (AI) repose en partie sur des biomarqueurs sériques issus du champignon tel que l'antigène galactomannane (GM) qui a amélioré la précocité de ce diagnostic. Ils sont utilisés pour réaliser un suivi régulier des patients les plus à risques car sont non invasifs. Cependant, leurs limites en termes de sensibilité et de spécificité imposent le recours à d'autres marqueurs afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses diagnostiques. C'est dans ce cadre que les méthodes moléculaires, développées pour mettre en évidence l'ADN fongique circulant, trouvent tout leur intérêt.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer, d'évaluer les performances et mettre en place la recherche d'ADN d'*Aspergillus fumigatus* dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du C.H.U. de Grenoble afin de mettre cet outil à disposition des médecins dans le but d'améliorer le diagnostic d'AI.

# Rappel bibliographique sur l'aspergillose invasive

## 1. Agents responsables

### 1.1. Généralités

Les *Aspergillus* spp. sont des champignons saprophytes de l'environnement. Ces moisissures se développent aux dépens des végétaux en décomposition (4). Au contact de l'air, le mycélium (thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés à 45°) est capable de former des conidiophores produisant une grande quantité de conidies (présenté en figure 2).

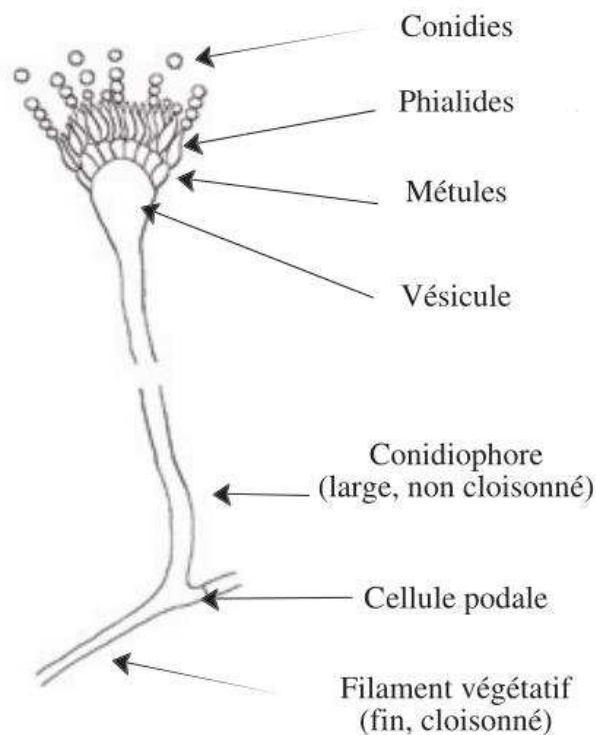


Figure 2 : représentation de l'appareil reproducteur des *Aspergillus* spp. (d'après (5))

Ces dernières sont efficacement dispersées par voie aérienne grâce à leur petite taille et leur paroi hydrophobe (1). Les spores aspergillaires se situent au 4<sup>ème</sup> rang des spores fongiques de l'air (5), après les spores d'*Alternaria* spp., de *Cladosporium* spp. et de *Penicillium* spp..

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont rencontrées aussi bien en milieu rural (principalement sur des végétaux en décomposition, le fumier) qu'en milieu urbain, en particulier dans les habitats où l'on note une augmentation importante de sa présence depuis ces dernières années (6). Ceci pourrait être expliqué par la meilleure isolation des habitations, augmentant le taux d'humidité. En intérieur, ce sont les poussières qui contiennent habituellement les *Aspergillus* spp. en particulier derrière les meubles ou les cadres, dans les faux plafonds et les conduits d'aération mais aussi dans la terre des plantes en pots (7).

## 1.2. Historique

Les *Aspergillus* spp. ont été décrits pour la première fois en 1729 par Pier Antonio Micheli (8). En observant le champignon à la loupe, sa structure lui rappela un dispositif utilisé par le clergé catholique pour réaliser une aspersion d'eau bénite lors d'une partie de la liturgie chantée appelée l'« *Asperges me* ». Ce dispositif appelé *aspergillum* (présenté en figure 3) donna alors son nom au champignon.



Figure 3 : photo d'un *aspergillum* (d'après (9))

La première observation d'une infection à *Aspergillus* spp. chez l'homme a été publiée par Plaignaud, médecin à l'Hôtel-Dieu (10) en 1791 : il s'agissait d'une sinusite contractée par un jeune soldat de 22 ans. Par la suite, le premier cas de pneumopathie aspergillaire a été décrit par J.H. Bennett en 1842 (11) : le champignon a été observé dans les poumons d'un patient décédé des suites d'un pneumothorax. La première description d'*A. fumigatus* date de 1863 (12) et a été réalisée par Georg Wolfgang Fresenius. Sa représentation est visible en figure 4.

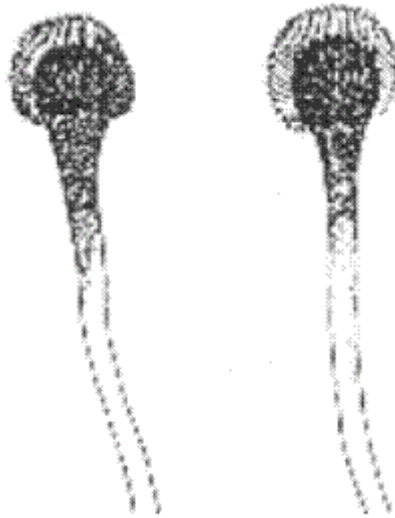


Figure 4 : représentation d'*A. fumigatus* par Fresenius (d'après (13))

La description complète du genre *Aspergillus* a été réalisée par Thom et Church en 1926 (8).

### 1.3. Classification

Les *Aspergillus* spp., peuvent présenter à la fois des formes sexuées (champignons parfaits) et des formes asexuées (champignons imparfaits). Il existe environ 190 espèces d'*Aspergillus* mais seule une vingtaine est impliquée en pathologie humaine. La classification est différente selon les stades sexués ou asexués. La nomenclature nous impose d'utiliser le nom d'espèce de la forme sexuée lorsqu'elle existe mais en pratique clinique on utilise plus volontiers le nom de la forme asexuée. La classification des formes asexuées est la suivante (5) :

- règne : *Fungi*,
- phylum : *Deuteromycotina (Fungi Imperfecti)*,
- classe : Hyphomycètes,
- ordre : Moniliales,
- famille : *Monoliliaceae*,
- genre : *Aspergillus*,
- sous-genre : *Aspergillus, Ornati, Fumigati, Clavati, Circumdati, Nidulantes*,
- section : *Aspergillus, Restricti, Clavati, Fumigati*.

### 1.4. Morphologie

#### 1.4.1. Macroscopique (5) (7)

Les *Aspergillus* spp. présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Ils sont pour la plupart inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates formées de courts filaments aériens blancs. C'est en effet avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures selon les espèces) que les colonies vont prendre leur teinte caractéristique. La couleur de la colonie permet une orientation rapide du diagnostic d'espèce. Le milieu de référence pour les *Aspergillus* spp. est le milieu de Czapek, il stimule l'apparition de fructifications. La température optimale de culture est 22 à 25°C selon les espèces sauf pour *A. fumigatus* qui est une espèce thermo-tolérante, poussant mieux à 37°C.

#### 1.4.2. Microscopique (5) (7)

Sur le mycélium d'*Aspergillus* spp. prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés, appelés conidiophores. Ils se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle s'accrochent des cellules conidiogènes appelées phialides. Les phialides peuvent être portées par des petits articles appelés métules. La conidiogenèse correspondant à une reproduction asexuée qui s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides. Les conidies restent accolées les unes aux autres en chaîne ramifiée, la plus jeune étant à la base de la chaîne, à côté de la phialide. L'ensemble conidiophore – vésicule – (métules) – phialides – conidies est appelé tête aspergillaire (figure 2). Sans métule, ces têtes sont dites unisériées alors qu'elles sont dites bisériées en présence de métules.

#### 1.4.3. Diagnostic d'espèce (7)

L'identification des *Aspergillus* spp. en culture repose habituellement sur la morphologie macroscopique et microscopique. Elle se fera essentiellement sur :

- la couleur et la texture des colonies,
- la couleur, la taille et la forme des conidies,
- l'aspect général de la tête aspergillaire (radiée ou en colonne) liée à la disposition des phialides,
- la présence ou non de métules,
- la forme de la vésicule (sphérique, hémisphérique, en massue...),
- la couleur, la longueur et l'aspect du conidiophore (rugueux ou lisse),
- la présence de signes de reproduction sexuée (cellules en noisette ou Hülle cells, cléistothèces),

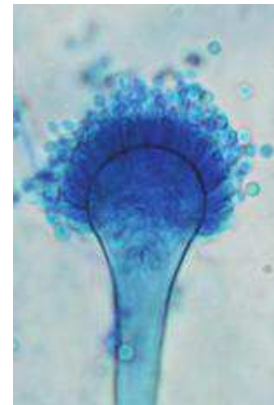
- la présence de sclérotes (formes de résistance).

#### 1.4.4. Caractéristiques des espèces responsables d'aspergilloses invasives

Les espèces responsables d'AI sont principalement : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. glaucus*, *A. terreus*, *A. versicolor*. Les morphologies macroscopiques et microscopiques de ces espèces sont décrites dans le tableau I et présentées en figure 5.



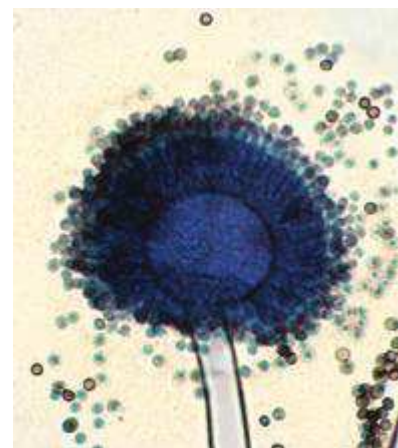
*Aspergillus  
fumigatus*



*Aspergillus flavus*



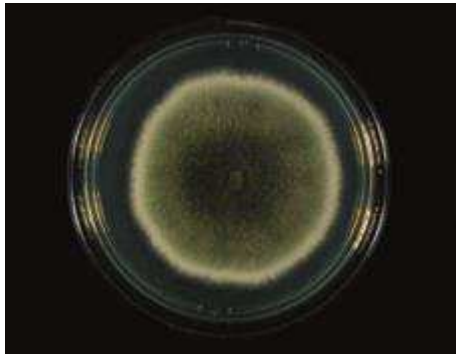
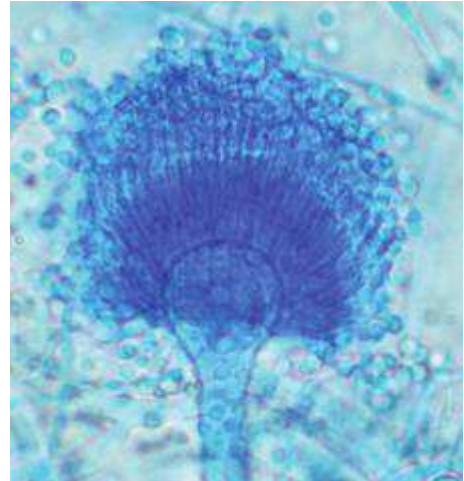
*Aspergillus niger*



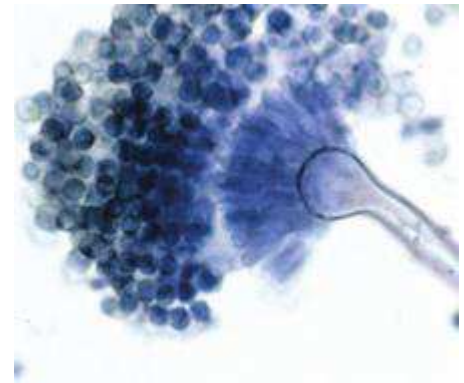




*Aspergillus  
terreus*



*Aspergillus  
nidulans*



*Aspergillus  
versicolor*

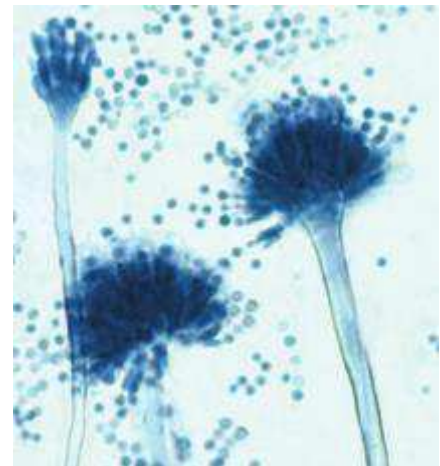


Figure 5 : aspects macroscopiques et microscopiques des principales espèces d'*Aspergillus* spp. retrouvées au cours des AI (d'après (5))

Espèce	Couleur de la colonie (aspect)	Température de culture (thermo tolérance)	Conidiophore (longueur)	Vésicule	Tête	Conidies	Autre
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bleu-vert (jeune) puis vert foncée et grise (vieille) (poudreuse)	40-42°C (45°C)	Lisse et incolore (300 µm)	Hémisphérique	En colonne compacte, unisériée	Globuleuses et échinulées	
<i>Aspergillus flavus</i>	Verte-jaune (duveteuse à poudreuse)	37°C	Rugueux et hyalin (1 à 2,5 mm)	Sphérique	Radiée, uni ou bisériée	Globuleuses, grosses et échinulées	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Vert cresson (veloutée)	25°C (37°C)	Lisse et brun (75 à 100 µm)	Hémisphérique, petite et brune	En colonne évasée, bisériée	Vertes, globuleuses et échinulées	Cléistothèces et Hülle cells
<i>Aspergillus niger</i>	Noire (granuleuse)	25-30°C (42°C)	Lisse et hyalin (1,5 à 3 mm)	Globuleuse et grosse	Radiée, bisériée, noire	Abondantes, globuleuses, grosses et échinulées	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Variable (rosée, jaunâtre, ocre ou verte) (plates et poudreuses)	25-30°C (40°C)	Lisses, incolores et réfringents (500 à 700µm)	Ovale ou parfois globuleuse	Radiée, bisériée + pseudo-pinceaux	Globuleuses et échinulées	Parfois Hülle cells
<i>Aspergillus terreus</i>	Brun noisette ou cannelle (duveteuses à poudreuses)	20-25°C (37°C)	Lisse et sinueux (100 à 250µm)	Globuleuse et assez grosse	En colonne compacte, bisériée	Lisses et hyalines, de petite taille	Parfois aleuries solitaires

Tableau I : principaux caractères macroscopiques et microscopiques des *Aspergillus* spp. responsables d'AI

Il est à noter qu'*A. fumigatus* tel qu'il est rendu par le laboratoire peut recouvrir un nombre important d'espèces morphologiquement proches : c'est le complexe *A. fumigatus*. (14) Ce complexe appartient aux *Aspergillus* unisériés de la section *Fumigati* du sous-genre *Fumigati*. Il regroupe plus de 20 espèces morphologiquement très proches (les formes sexuées sont appelées *Neosartorya* spp.) dont *A. lentulus* ou *N. udagawae*.

#### 1.4.5. Fréquences d'isolement

Dans la population adulte, *A. fumigatus* est le champignon le plus fréquemment isolé (de 70% (15) à 90% (16) des isollements), et ce dans toutes les populations, qu'elles soient générale (15), greffée de cellules souches (17) (18) ou greffée d'organe solide (19). La prévalence des autres espèces (*A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*) est faible (inférieure à 10%) (15). La prévalence des espèces non-*fumigatus* semble cependant en augmentation (20). Comme dans la population adulte, *A. fumigatus* est le champignon le plus fréquemment retrouvé dans les AI pédiatriques (21). Les autres espèces principalement retrouvées chez l'enfant sont *A. flavus*, *A. terreus* et *A. niger*.

## 2. Physiopathologie

### 2.1. Facteurs de virulence d'*Aspergillus fumigatus*

Comme expliqué en première partie, les *Aspergillus* spp. ne sont pas les champignons les plus représentés dans notre environnement. Ceci est particulièrement vrai pour *A. fumigatus*, très minoritaire parmi les spores présentes dans l'air alors que cette espèce est responsable d'environ 90% des infections aspergillaires chez l'Homme (22). Ce paradoxe trouve son explication dans la biologie de cette espèce mettant en évidence de nombreux facteurs pouvant expliquer sa survie et son développement chez l'homme.

La virulence d'*A. fumigatus* est multifactorielle (22). Elle est liée à :

- la structure du champignon et notamment sa paroi,
- sa capacité d'adaptation et de croissance en condition de stress,
- la mise en place de mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire,
- la capacité à causer des dommages à l'hôte et notamment sa capacité d'invasion,
- sa capacité à résister aux traitements antifongiques,
- ses propriétés allergisantes.

### 2.1.1. Structure du champignon : paroi

La paroi fongique est un élément extrêmement important dans la virulence du champignon. En effet, celle-ci assure la protection de la cellule fongique dans l'environnement hostile que représente l'hôte. Elle participe également à la virulence du fait de sa rigidité. La croissance polaire du mycélium, associée à la haute rigidité de la paroi (conférée par sa structure), explique la capacité du champignon à franchir les barrières anatomiques en l'absence de réponse immunitaire. Ainsi la paroi est considérée à la fois comme une armure et comme une arme (23). Elle assure également les principales interactions avec l'hôte (structure exposée par le champignon) et représente la cible principale du système immunitaire (24). Sa complexité et son rôle prépondérant dans la structure du champignon font de la paroi une cible très importante dans le développement des traitements antifongiques (25). La paroi fongique (présentée en figure 6) est principalement composée de polysaccharides (plus de 90% de la paroi) et de protéines. Les polysaccharides sont représentés par :

- les (1→3)- $\beta$ -D-glucanes (20 à 35% de la paroi),
- les galactomannanes (20 à 25%),
- les  $\alpha$ -1,3-glucanes (35 à 46%),
- la chitine.

Par ailleurs, il est possible d'observer des couches supplémentaires telles que la présence de couches hydrophobes présentes sur les hyphes et les conidies ainsi qu'une couche de mélanine uniquement présente sur les conidies. Des acides sialiques ont également été détectés à la surface des conidies.

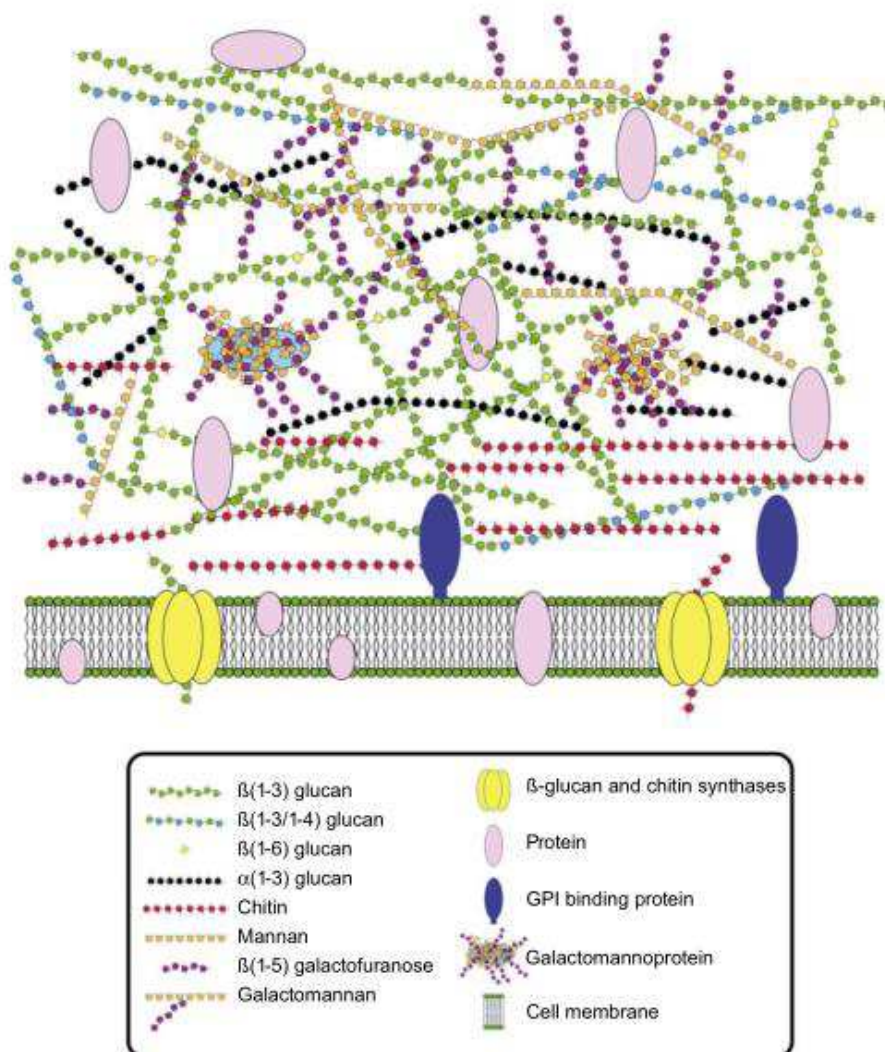


Figure 6 : structure de la paroi d'*A. fumigatus* (d'après (22))

#### 2.1.1.1. (1→3)-β-D-glucane (BG)

Composant majeur de la paroi avec les α-1,3-glucanes, ces polysaccharides sont des structures importantes reconnues par les cellules du système immunitaire (PAMPs). Les BG sont capables d'activer le complément et de déclencher des réponses inflammatoires par le biais de médiateurs biologiques tels que les leucotriènes et le TNF-α. Les BG en tant que marqueurs sécrétés par le champignon sont également impliqués dans le diagnostic de l'AI car sont détectables dans le sérum des patients infectés. L'utilisation des BG dans le diagnostic des AI sera détaillée dans la partie « Diagnostic biologique ».

#### 2.1.1.2. Galactomanne (GM)

Le GM est un polysaccharide composé d'une chaîne principale constituée de mannoses branchée latéralement par des courtes chaînes de galactoses reliées au mannane. Cette

structure aurait également un rôle de PAMP et pourrait servir dans l'adhésion aux composants de l'hôte tels que la laminine et la fibronectine. Par ailleurs, le GM est capable de se lier aux récepteurs des cellules de l'immunité dont la pentraxine-3. Le GM est le principal composant relargué dans l'organisme au décours des AI et peut être utilisé dans son diagnostic. Cette utilisation est détaillée dans la partie « Diagnostic biologique ».

## 2.1.2. Capacité d'adaptation et de croissance en situation de stress

### 2.1.2.1. Thermotolérance

*A. fumigatus* est un champignon capable de pousser jusqu'à une température de 55°C et de survivre jusqu'à une température de 75°C. Cette caractéristique essentielle lui permet donc de se développer aisément chez l'Homme à 37°C. Certaines études montrent une corrélation entre la capacité des espèces d'*Aspergillus* à se développer à 37°C et leur prévalence en santé humaine (26).

### 2.1.2.2. Adaptations nutritionnelles chez l'hôte en situation invasive

La disponibilité en nutriments est un facteur essentiel de la survie et de la croissance dans l'hôte. De même que ces moisissures ont la capacité de se nourrir à partir des végétaux en décomposition lorsqu'elles sont dans leur environnement habituel, elles vont trouver ces nutriments *in vivo* en lysant les tissus grâce à des enzymes comme l'élastase et les phospholipases (22). L'élastase est capable de dégrader la matrice extracellulaire. La relation entre invasivité et présence d'élastase reste néanmoins controversée (27) (28). Les phospholipases sont capables d'altérer les membranes des cellules de l'hôte pour aboutir à leur destruction. Des taux importants de phospholipases ont été démontrés dans des situations d'AI (27).

Par ailleurs, certains nutriments comme le fer et le zinc sont indispensables à la croissance du champignon et celui-ci doit être capable de l'absorber chez l'hôte. L'absorption du fer se fait notamment grâce à des sidérophores qui sont indispensables à la survie du champignon, mais l'ensemble du métabolisme est complexe et de nombreuses enzymes sont impliquées (29).

### 2.1.2.3. Adaptations métaboliques en situation de stress

Le champignon est capable de répondre et de s'adapter au changement d'environnement (changement d'osmolarité, choc thermique, présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), hypoxie, pH) qui lui est proposé par le biais de différentes voies de signalisation lui indiquant

la nécessité de s'adapter pour survivre. Les principales voies de signalisation sont les MAP kinases (30) qui sont notamment capables d'intervenir dans la régulation osmotique du champignon et le maintien de la paroi fongique.

Une autre voie d'intérêt dans le cas des AI est la voie du *srbA* (31) : en effet ce système agit comme un capteur du taux d'oxygène et permet au champignon de s'adapter aux situations d'hypoxie rencontrées au cours de l'AI lors de l'infarctissement local du tissu pulmonaire.

### 2.1.3. Mise en place de systèmes d'échappement au système immunitaire

Le principal affaiblissement du système immunitaire provient de l'hôte lui-même par les pathologies sous-jacentes qu'il développe mais certains facteurs propres au champignon favorisent l'échappement.

#### 2.1.3.1. Les conidies et la paroi

Les conidies verruqueuses, de par leur petite taille (2 à 3  $\mu\text{m}$ ) sont capables d'atteindre directement les alvéoles pulmonaires en évitant d'être capturées par l'épithélium cilié des voies respiratoires (4). Par ailleurs en cas de phagocytose par les cellules épithéliales, ces dernières ne semblent pas en mesure de les détruire, aboutissant à un échappement au système immunitaire et créant un point de départ pour la dissémination. L'épaisse paroi fongique est également un frein à l'immunité innée puisqu'elle résiste aux complexes d'attaque membranaire formés lors de l'activation du complément (22).

#### 2.1.3.2. La mélanine et les hydrophobines

La mélanine est l'un des facteurs importants de virulence du champignon (22) :

- la pigmentation de la surface des conidies permet au champignon de limiter le dépôt des fractions C3 du complément et d'inhiber l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNN),
- elle protège le champignon contre les ROS,
- elle est capable de masquer les BG vis-à-vis du système immunitaire et donc limiter l'initiation d'une réponse anti-aspergillaire.

La couche hydrophobe présente sur la paroi fongique permet également au champignon de lutter contre le stress oxydant capable de détruire le champignon, notamment au niveau des

macrophages alvéolaires : cette couche est constituée principalement de protéines appelées hydrophobines (32).

#### 2.1.3.3. Equipement enzymatique du champignon

Le champignon est capable de produire diverses enzymes qui lui permettent de lutter contre les ROS produites notamment par les cellules de l'immunité innée :

- les catalases (33),
- les superoxydes dismutases (SOD) (34),
- les glutathion transférases (GST) (35).

D'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras sont capables d'altérer le métabolisme des prostaglandines chez l'hôte et d'en diminuer sa réponse immunitaire innée (36).

#### 2.1.4. Capacité de causer des dommages à l'hôte : toxines

Le champignon est capable, lors de la croissance des hyphes fongiques, de produire diverses toxines appelées mycotoxines. Elles peuvent être soit sécrétées par celui-ci soit relarguées après sa mort. Elles peuvent également être incorporées aux conidies lors de la conidiogenèse. Ces toxines sont responsables de lésions chez l'hôte.

La toxine majeure d'*A. fumigatus* est la gliotoxine : c'est une toxine de la famille des polythiodioxopipérazines caractérisées par un pont disulfure présent sur un cycle pipérazine. La gliotoxine a plusieurs rôles immunosuppresseurs (22) :

- l'inhibition de la phagocytose par les macrophages alvéolaires
- l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T
- la capacité d'induire l'apoptose des monocytes
- l'altération du fonctionnement des PNN en inhibant la NADPH responsable de la formation de ROS.

Par ailleurs, il a été démontré que la gliotoxine est un facteur anti-angiogénique majeur d'*A. fumigatus* (37), ce qui renforce la virulence du champignon dans les situations invasives. Cette toxine est produite lors d'AI chez l'homme et elle est retrouvée dans le sérum des patients dans 80% des cas (38).



D'autres toxines sont retrouvées chez le champignon mais elles ne semblent pas impliquées dans la virulence du champignon en cas d'AI : la mitogilline (surtout impliquée dans les phénomènes allergiques), l'hémolysine, les aflatoxines ou encore la fumagilline.

#### 2.1.5. Sa capacité d'invasion

Le champignon possède des propriétés qui font de lui un pathogène redoutable, son angiotropisme et sa croissance polaire. L'angiotropisme d'*A. fumigatus* est basé sur l'existence d'un gradient en oxygène et en sucre entre le tissu pulmonaire et le sang (4). Ce gradient stimule la croissance fongique en direction du compartiment sanguin. Une publication récente (39) fait état de l'existence d'un facteur sérique capable de stimuler la croissance fongique et la formation de biofilms : la fétuine A. L'existence de ce « facteur de croissance aspergillaire » pourrait renforcer l'angiotropisme du champignon.

#### 2.1.6. Formation de biofilms

Il a été démontré récemment qu'*A. fumigatus* est capable de former des biofilms (40) (41). Ils sont constitués de mycéliums enchevêtrés dans une matrice extracellulaire complexe faite de composants de paroi fongique, d'hydrophobines, de systèmes enzymatiques de résistance aux antifongiques. Cette structure participe à la virulence du champignon en apportant à celui-ci une importante résistance aux thérapeutiques antifongiques (42). Elle est également source de dissémination secondaire.

#### 2.1.7. Propriétés allergisantes

*A. fumigatus* est capable de synthétiser des protéines responsables de réponses immunitaires de type Th-1 chez certains patients. La nomenclature de ces allergènes comporte 23 composés numérotés de Asp f-1 à Asp f-34 (22).

### 2.2. Mécanismes de défense immunitaire contre *Aspergillus fumigatus* chez l'immunocompétent

#### 2.2.1. Immunité innée (figure 7)

##### 2.2.1.1. Généralités

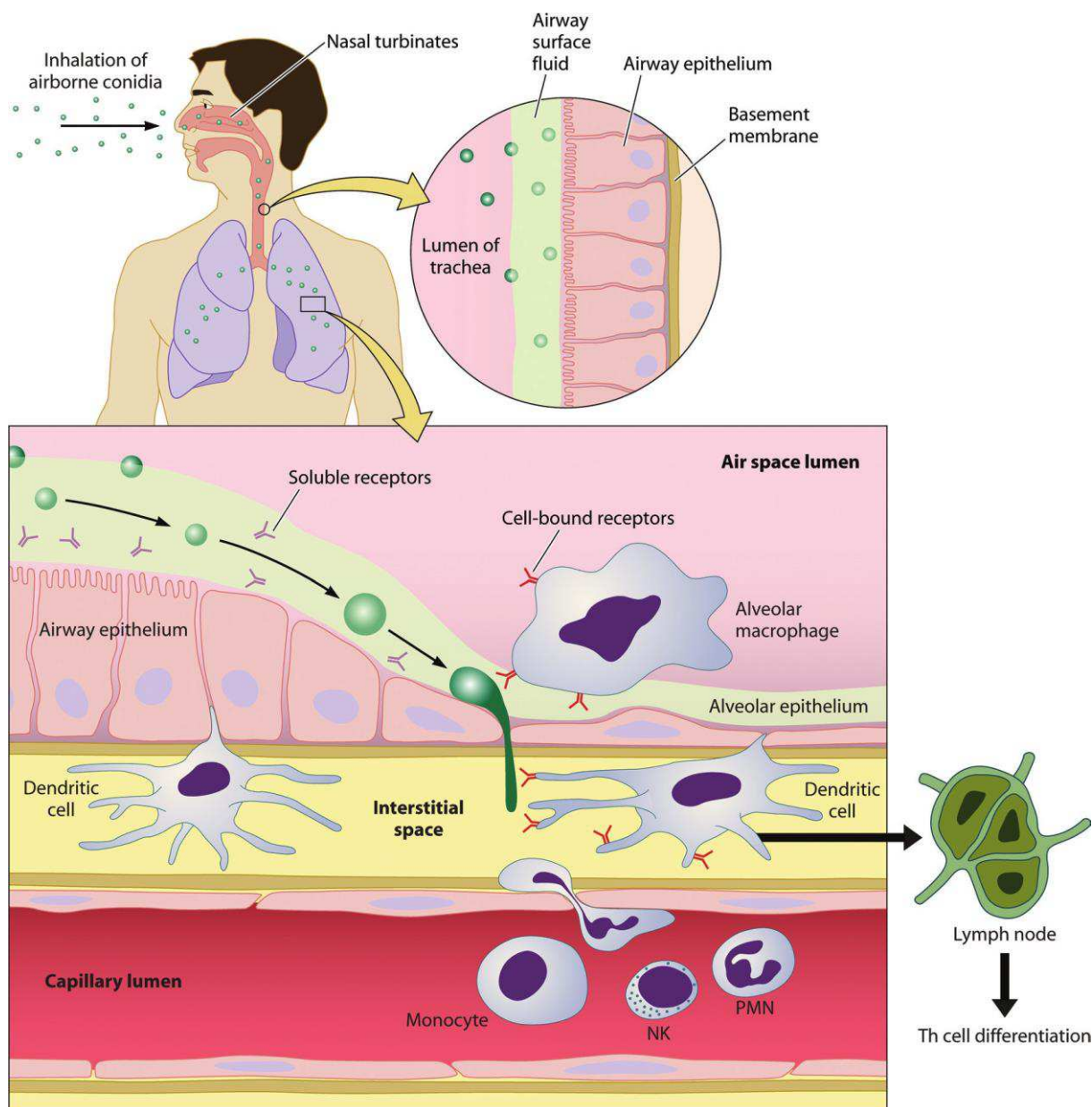


Figure 7 : représentation de l'immunité innée anti-aspergillaire après l'inhalation de spores d'*Aspergillus* spp. (d'après (1))

La première des défenses est l'épithélium respiratoire (43). C'est une barrière anatomique contre les spores inhalées qui sont éliminées via la clairance muco-ciliaire (les spores sont transportées activement par les cellules ciliées jusqu'au carrefour oro-pharyngé où elles sont soit dégluties soit recrachées) et via la phagocytose par les cellules épithéliales. C'est le mécanisme majeur de défense antimicrobienne au niveau des poumons (1). La plupart des spores d'*A. fumigatus* est éliminée par ce mécanisme (44). Cependant, la faible taille des spores aspergillaires leur permet d'échapper à cette première ligne. C'est pourquoi les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques (1) constituent la principale ligne de défense capable de phagocyter les conidies inhalées. Les monocytes et les PNN peuvent

ensuite être recrutés depuis le sang périphérique (43). Après la germination, les PNN deviennent la principale défense contre le mycélium.

Il est à noter qu'une conidie inhalée non détruite par l'immunité innée peut bourgeonner et former du mycélium en 12 à 15 heures (1). Les principales étapes de développement d'une spore aspergillaire sont les suivantes : verruqueuse, gonflée, germinative, mycélium (44). Les principaux récepteurs capables de reconnaître les constituants de l'*Aspergillus* sp. sont les TLR, la dectine-1, les protéines surfactantes A et D, les MBL ainsi que la pentraxine-3. (43)

#### 2.2.1.2. Cellules de l'immunité innée

##### 2.2.1.2.1. Macrophages alvéolaires

Ils constituent la première ligne de défense cellulaire contre les conidies atteignant les alvéoles. L'élimination se fait par phagocytose et est très efficace car 90% des conidies sont éliminées en 30 heures (44).

##### 2.2.1.2.2. Polynucléaires neutrophiles recrutés

Les PNN sont capables de détruire le mycélium d'*A. fumigatus*. Le résultat est obtenu par dégranulation des polynucléaires dans le milieu où le champignon se trouve (44). Leur capacité à détruire *A. fumigatus* dépend entièrement des TLR-2 et 4 ainsi que de la dectine-1 (4).

Leur action anti-*Aspergillus* est principalement basée sur la formation par les polynucléaires de ROS capables de détruire les conidies lors d'une phagocytose. Ces ROS sont créées grâce à une enzyme, la NADPH oxydase. Leur rôle est direct (toxicité des ROS) et indirect (activation des enzymes vacuolaires responsables d'une lyse fongique). Les PNN peuvent également attaquer le mycélium par une dégranulation qui aboutit à la libération de ces enzymes dans le milieu extracellulaire.

Les ROS peuvent également induire la formation de pièges extracellulaires appelés NETs (neutrophil extracellular traps) présentés en figure 8 : ils sont constitués de chromatine recouverte de protéines et se forment lors de l'apoptose d'un PNN. Ce mode de défense aussi appelé « NETosis », démontré in vivo chez l'animal, occupe un rôle important dans la défense anti-aspergillaire (45) :

- il a été démontré en présence d'*A. fumigatus*,
- il est surtout actif sur le mycélium, qu'il est capable de détruire, et très peu sur les conidies, qu'il semble incapable de détruire,
- les hydrophobines d'*A. fumigatus* sont capables d'inhiber la NETosis.

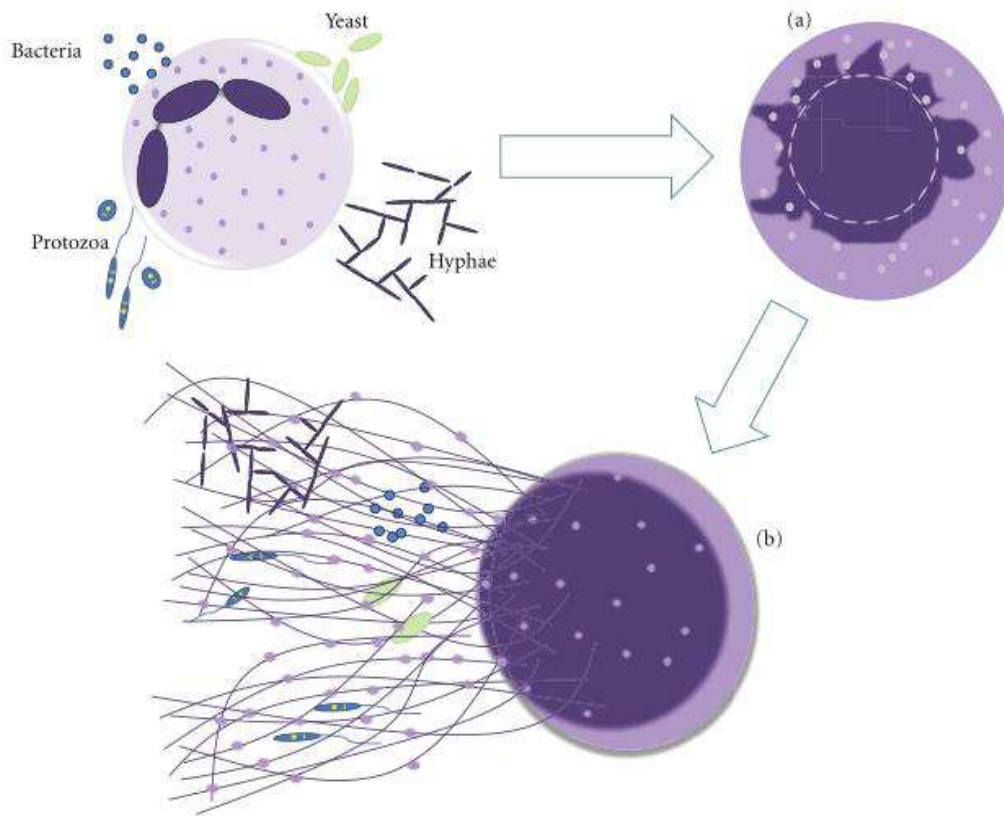


Figure 8 : NETosis d'un PNN après un contact avec *A. fumigatus* (d'après (46))

#### 2.2.1.2.3. Cellules natural-killer (NK)

Ces cellules interviennent également dans la réponse innée anti-aspergillaire par le biais de plusieurs mécanismes (4) (47) :

- stimulation de la phagocytose par sécrétion d'interféron gamma,
- stimulation de la voie Th1 par sécrétion d'interféron gamma et de  $\text{TNF-}\alpha$ ,
- cytotoxicité directe des cellules NK activées par de l'interleukine-2 : cette cytotoxicité est médiée par des facteurs solubles (interféron gamma) et ne nécessite pas de dégranulation des cellules NK, même si cette dernière semble exercer aussi un rôle dans la défense anti-aspergillaire par le biais des perforines (48).

Les cellules NK ne sont pas actives sur les conidies et nécessitent la germination du champignon. Le contact avec le champignon est indispensable pour l'activation des cellules.

#### 2.2.1.3. Récepteurs solubles

##### 2.2.1.3.1. Protéines surfactantes A et D

Elles sont essentielles au fonctionnement pulmonaire ainsi qu'aux défenses de l'hôte. Elles permettent l'agglutination des conidies et leur liaison aux PNN ainsi qu'aux macrophages alvéolaires. Elles favorisent également la phagocytose et la lyse des conidies par les PNN. Récemment, il a été montré qu'elles sont capables d'activer le complément. (26)

##### 2.2.1.3.2. Pentraxine-3

C'est une protéine multimérique de la phase aiguë de l'inflammation (4). Elle est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques en présence de conidies. Ce récepteur soluble se lie au GM et permet la reconnaissance par les cellules effectrices de l'immunité (44). Il est également capable d'activer le complément par la voie des lectines.

#### 2.2.1.4. Récepteurs liés aux cellules

##### 2.2.1.4.1. TLR

Les TLR sont une famille de 9 récepteurs très conservés capables de reconnaître des domaines conservés d'agents pathogènes (dont les *Aspergillus* spp.) et pouvant ainsi de générer une réponse cellulaire par le biais de la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS (1). Ils ont un rôle essentiel dans la défense antifongique (49). Le TLR-2 est capable de reconnaître les bêta-glucanes et d'induire une réaction de défense médiée par les cytokines pro-inflammatoires (43). Le TLR-4 intervient également dans la défense anti-aspergillaire.

##### 2.2.1.4.2. Dectine-1

C'est un récepteur majeur des bêta-glucanes et il est exprimé de manière importante chez les macrophages, les PNN et les cellules dendritiques. (1). Son rôle dans l'immunité innée est limité aux premiers stades de l'infection (4).

#### 2.2.1.5. Cytokines impliquées dans la transmission des signaux

La reconnaissance de l'*Aspergillus* sp. par l'ensemble de ces récepteurs aboutit rapidement à la production de cytokines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que le TNF- $\alpha$  et les interleukines 1 et 18. (1)

#### 2.2.2. Immunité adaptative : réponse cellulaire

Cette défense s'active en l'absence d'efficacité de la réponse innée qui normalement suffit à détruire les conidies inhalées chez un sujet sain (4). Elle aboutit à la formation d'une immunité acquise envers l'*Aspergillus* sp. Les lymphocytes sont recrutés au niveau des ganglions médiastinaux et apparaissent dès 3 jours pour un pic vers 7 jours (1).

##### 2.2.2.1. Lymphocytes T

La présence d'*Aspergillus* sp. dans l'organisme entraîne une différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par la voie Th1 de manière préférentielle (1). Des lymphocytes produisant de l'interleukine 17 interviennent également dans la réponse cellulaire contre l'*Aspergillus* sp. en favorisant le recrutement des PNN (43).

##### 2.2.2.2. Lymphocytes B

Le rôle actuel des lymphocytes B et, en définitive, des anticorps anti-*Aspergillus* produits par les plasmocytes reste encore clairement à déterminer (4).

### 2.3. Histoire naturelle de l'AI

La porte d'entrée la plus fréquente est la voie pulmonaire (il est cependant possible de développer des AI par infection sur cathéter ou d'origine digestive (50)).

#### 2.3.1. Atteinte pulmonaire

Les premiers stades de l'infection au niveau pulmonaire sont présentés en figure 9.

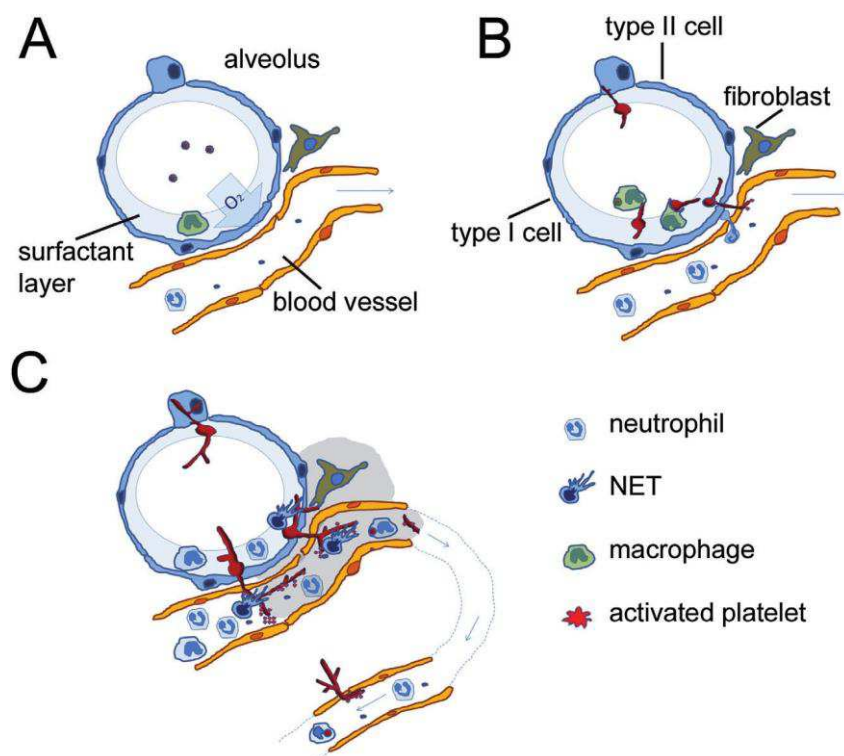


Figure 9 : représentation de la réponse innée anti-aspergillaire au début d'une AI (d'après (4))

- a. Arrivée des conidies au niveau des alvéoles pulmonaires
- b. Germination des spores et premières interactions avec les cellules de l'immunité innée
- c. Stade tardif de l'infection avec envahissement du compartiment vasculaire par les hyphes mycéliens, hypoxie (en gris) et dissémination du champignon

L'infection débute donc par l'inhalation de conidies d'*A. fumigatus*. S'en suit leur dépôt dans les voies aériennes (bronchioles et espaces alvéolaires). En l'absence de clairance immunitaire des conidies (par les macrophages puis secondairement par les PNN), le développement fongique peut se réaliser in situ. Des hyphes se développent en 12 à 15 heures à partir des conidies inhalées (22). Selon l'évolution de l'immunodépression responsable de ce développement pulmonaire, l'infection peut évoluer sur deux modes :

- la dissémination en l'absence de restauration immunitaire ou de traitement,
- la circonscription en cas de reconstitution immunitaire et de traitement.

### 2.3.2. Restauration immunitaire et syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire

Une diminution des traitements immunosuppresseurs dans les greffes d'organes ou une récupération de neutropénie en hématologie correspondent à une levée de l'immunosuppression. Le système immunitaire devient capable de circonscrire les zones infectées, aboutissant à la nécrose pulmonaire localisée. La zone nécrosée se sépare alors du parenchyme pulmonaire sain, et se retrouve entourée d'un croissant gazeux.

Cette restauration immunitaire peut également s'accompagner d'une aggravation clinique avec évolution des lésions pulmonaires. Cet état correspond à un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS) (51). La restauration des fonctions phagocytaires aboutit à un syndrome inflammatoire global pouvant mimer une progression de l'AI.

Cette possibilité ne doit pas être ignorée en cas d'aggravation du patient au cours du traitement de l'AI. Le diagnostic d'IRIS (51) au cours de l'AI repose à la fois sur des critères cliniques (aggravation des lésions pulmonaires sans nouvelle lésion extrapulmonaire, relation temporelle avec la levée de l'immunosuppression) et biologiques (diminution d'au moins 50% du GM sans modification de traitement).

#### 2.3.3. Dissémination et localisations secondaires

Le développement mycélien permet le passage de l'épithélium pulmonaire aboutissant à la mise en contact directe avec la circulation sanguine (4), qui est responsable d'un infarctissement local par thrombose et d'une hypoxie. L'organisme tente de répondre à l'hypoxie par une angiogenèse que le champignon inhibe *via* la gliotoxine (37). De courts fragments mycéliens sont alors capables de se détacher librement dans le flux sanguin ou par le biais des cellules phagocytaires (4). Cette libération sanguine est responsable d'une dissémination sanguine de l'AI qui aboutit à la formation de localisations secondaires de l'infection depuis le compartiment sanguin.

### 3. Epidémiologie

#### 3.1. Patients à risque dans la population adulte

Les principaux facteurs de risque chez l'adulte sont des déficits immunitaires acquis :

- sujets neutropéniques (70% des AI) :
  - o pathologies hématologiques,
  - o cancers d'organes solides,



- sujets non-neutropéniques (30% des AI) :
  - o transplantation d'organes,
  - o pathologies pulmonaires chroniques,
- situations rares :
  - o infection par le VIH au stade SIDA,
  - o thérapeutiques immunosuppressives au cours de pathologies inflammatoires.

### 3.1.1. Pathologies hématologiques

La majorité (70 à 80%) des AI de l'adulte se retrouve dans ce groupe de patients. (52) (53) (54)

#### 3.1.1.1. Cancers hématologiques (55) (56)

Les principales maladies à risque de développer des AI sont les leucémies aiguës (myéloïdes et lymphoïdes), les leucémies lymphoïdes chroniques et myéloïdes chroniques, les myélomes multiples, les lymphomes non hodgkiniens et la maladie de Hodgkin. L'incidence de l'AI chez ces patients est variable selon la pathologie préexistante et entre les différents centres. Pour les leucémies aiguës, l'incidence varie de 2 à 49% (53) (57).

Les chimiothérapies anticancéreuses (en phase d'induction, de consolidation ou en protocole de sauvetage) induisent chez ces patients une profonde neutropénie (et aussi une lymphopénie). Cet état d'immunosuppression (dont la durée peut être limitée par l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques tels que le GM-CSF) est favorable au développement des AI. Les corticothérapies parfois utilisées dans le traitement des LAL peuvent aussi expliquer la survenue de la pathologie.

#### 3.1.1.2. Greffe de cellules souches (18) (50) (58) (59)

2 périodes à risque d'AI sont généralement définies :

- la phase neutropénique suivant le conditionnement pré-greffe,
- les phases aiguë et chronique de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD).

L'incidence est variable selon les centres et le type de greffe (17) (19) (52) (53) (60); elle varie de 2,5 à 12,8% en cas d'allogreffe et de 0,9 à 4,8% en cas d'autogreffe.

Le mécanisme expliquant le développement des AI lors du conditionnement pré-greffe est le même que pour les pathologies hématologiques : une profonde neutropénie. Durant cette phase, le risque d'AI est dépendant de la rapidité de la restauration immunitaire. Cette vitesse de récupération est influencée par l'origine du greffon (61) : il a été démontré qu'un greffon issu de dons de cellules souches périphériques permettait une récupération plus rapide de l'immunité et donc un risque moindre d'AI. A l'inverse, un greffon provenant de sang de cordon engendre un retard de restauration de l'immunité et donc un risque accru d'AI.

Concernant la phase de GVHD, à la fois le traitement (corticostéroïdes à haute dose) et la GVHD en elle-même (62) sont responsables d'une altération du fonctionnement des PNN favorable au développement des AI. La lymphopénie pourrait également être associée au risque accru d'AI. (61)

### 3.1.2. Transplantations d'organes solides (63) (64) (65) (66)

L'AI peut concerner l'ensemble des greffes d'organes (cœur, rein, foie, poumons...). L'incidence est variable selon l'organe et le centre (19) (52) (53) (67) :

- 11,1% dans le cas de greffe cœur-poumon
- 2,0 à 6,0% dans les greffes pulmonaires
- 1,0 à 5,2% dans les greffes cardiaques
- 0,8 à 2,0% dans les greffes du foie
- 0,2 à 0,7% dans les greffes de rein

Le principal facteur expliquant la survenue d'AI chez ces patients est l'utilisation de traitements immunosuppresseurs au long cours dans la lutte contre le rejet de greffe (corticostéroïdes, sirolimus, infliximab...) mais la colonisation préalable de l'organe par des spores aspergillaires augmente le risque d'AI (expliquant la plus grande fréquence d'AI chez les patients transplantés pulmonaires). Chez les patients ayant subi une greffe d'organe solide, l'AI survient principalement dans les 3 premiers mois après la transplantation lorsque l'immunodépression est la plus importante.

### 3.1.3. Maladies pulmonaires chroniques (63) (68)

Chez ces patients présentant des pathologies respiratoires chroniques telles que la BPCO, l'asthme chronique, l'emphysème ou encore la mucoviscidose, il est possible d'observer des AI. Ces cas, bien qu'ils ne représentent pas la principale expression clinique des infections à

*Aspergillus* spp. chez ces patients, sont principalement expliqués par une importante colonisation aspergillaire et des facteurs favorisant tels que l'utilisation de corticostéroïdes ou encore des altérations des barrières épithéliales.

### 3.2. Facteurs de risque dans la population pédiatrique (69) (70)

Les principaux facteurs de risque d'AI chez les enfants sont semblables à ceux de l'adulte avec quelques spécificités :

- situations pédiatriques :
  - o déficits immunitaires primitifs dont la granulomatose septique chronique,
  - o enfants prématurés et petit poids de naissance.

#### 3.2.1. Granulomatose septique chronique (71)

La granulomatose septique chronique est une maladie héréditaire (1 cas sur 250 000 personnes) responsable d'une anomalie de fonctionnement du complexe NADPH oxydase des PNN et des macrophages. Ce complexe, responsable de la formation de ROS, est primordial dans la défense anti-aspergillaire. L'incidence des AI chez ces patients est d'environ 0,5%.

### 3.3. Facteurs de risque récemment identifiés

#### 3.3.1. Infection par la grippe H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>

Récemment un nouveau facteur prédisposant a pu être mis en évidence lors de l'épidémie de de grippe H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. En effet, 30% des formes sévères se sont compliquées d'AI. Les hypothèses pouvant expliquer le risque accru étaient la ventilation mécanique, les dégâts parenchymateux et alvéolaires et la lymphopénie associée (72).

#### 3.3.2. Prédispositions génétiques

Chez les patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches au cours de leur traitement pour leur pathologie hématologique, la survenue d'AI et leur pronostic ne peuvent pas être seulement expliqués par la neutropénie (plus ou moins prolongée) ou la GVHD (et la corticothérapie associée). Des facteurs additionnels existent : les polymorphismes génétiques présents à la fois chez le donneur de cellules souches et chez le receveur. Ces polymorphismes ont été recherchés sur les gènes codant pour les récepteurs cellulaires intervenant dans l'immunité innée anti-aspergillaire (par exemple les *toll like receptors*,

TLRs) mais aussi sur les gènes codant pour les cytokines impliquées au cours de la réponse immune anti-aspergillaire (73) (74).

Il a été démontré (49) que la présence du polymorphisme 1063A>G (ou D299G) du gène codant pour le TLR4 chez le donneur de cellules souches est associé à un risque plus important de développer des AI chez le receveur. Ce polymorphisme est l'origine d'une altération du fonctionnement du TLR4, ce qui conduit à une altération de reconnaissance des *Aspergillus* spp. par le système immunitaire. Par ailleurs, il a été également démontré (75) un risque accru d'AI chez les receveurs d'allogreffe de cellules souches présentant le polymorphisme 1174C>T du gène codant pour le TLR5.

La découverte de ces nouveaux facteurs prédisposant aux AI permet une approche personnalisée du risque et nécessite d'être mieux étudiée. Les effecteurs de la réponse immune anti-aspergillaire sont étroitement liés dans leur fonctionnement et au-delà de simples polymorphismes de gènes, certains haplotypes à découvrir (aussi bien chez le donneur que chez le receveur) pourraient classer les patients en fonction d'un risque d'AI et ainsi amener à renforcer les mesures préventives en cas de risque accru d'AI.

## **4. Présentations cliniques, pronostic, prophylaxie et traitement**

### **4.1.Aspects cliniques**

#### **4.1.1. Aspergilloses invasives en hématologie**

La présentation clinique dépend du degré d'immunodépression (76) et concerne principalement les poumons (80 à 90% des AI) (77). On parle alors d'aspergillose pulmonaire invasive (API).

##### **4.1.1.1. API angioinvasive**

Dans le cas des patients neutropéniques ( $PNN < 100/mm^3$ ) (76), l'aspergillose est angioinvasive. Les lésions consistent donc en une zone centrale où se développe l'infection fongique (« nid ») entourée par une zone de thrombose vasculaire et d'hémorragie, dues à l'angioinvasion. Les signes cliniques sont peu spécifiques : fièvre résistant à une antibiothérapie pendant plus de 48 heures, toux sèche, dyspnée, hémoptysie. L'angioinvasion, qui s'observe surtout chez le patient neutropénique ( $PNN < 100/mm^3$ ) (76), se traduit par une douleur thoracique, conséquence de l'infarctissement pulmonaire. On note que la fièvre prolongée peut être le seul signe clinique chez le patient neutropénique.

#### 4.1.1.2. API bronchoinvasive (26)

La forme bronchoinvasive se retrouve surtout chez le patient non neutropénique (PNN > 100/mm<sup>3</sup>) (76). Elle est caractérisée par un développement fongique limité, un infiltrat granulomateux, une nécrose tissulaire et une réponse inflammatoire excessive. Cette forme aboutit à une destruction de la paroi bronchiolaire (76). Cette réponse finalement localisée est la conséquence de l'altération des principales fonctions des PNN (aboutissant en temps normal à la destruction des conidies et du mycélium) telles que la phagocytose, la production de ROS, la production de cytokines et la migration cellulaire. L'inflammation excessive est responsable du décès chez ce type de patients par insuffisance respiratoire.

#### 4.1.2. Aspergillose trachéobronchique

Cette forme se retrouvait classiquement chez le patient VIH+ au stade SIDA et le greffé pulmonaire. La trachéobronchite peut s'accompagner d'une simple production excessive de mucus avec une inflammation ou être accompagnée d'ulcères et de pseudomembranes. Les signes cliniques sont semblables à l'API. La dissémination fongique au reste de l'organisme est possible dans les formes évoluées de l'infection par le VIH.

#### 4.1.3. Aspergillose sinusienne invasive

Cette forme n'intervient que chez 5 à 10% des patients concernés par une AI. Les signes précoces sont peu spécifiques : fièvre, toux, épistaxis et céphalées. Par la suite peuvent apparaître une rhinorrhée, des douleurs sinusiennes et une angine. L'aspergillose sinusienne invasive peut apparaître seule ou accompagner une API. Les complications locales avec extension au palais, à l'orbite voire au cerveau sont fréquentes et apparaissent rapidement.

#### 4.1.4. Autres formes cliniques

Ces formes, primitives ou secondaires, sont liées à un développement de l'infection fongique en un site anatomique peu fréquemment concerné. La localisation secondaire principale est le système nerveux central. Elle concerne 21% des AI (78). *A. fumigatus* est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et le risque principal est l'abcès parenchymateux, la méningite restant rare. Cette complication est souvent fatale (88% des cas) car la pénétration des antifongiques dans le liquide céphalorachidien est mauvaise et il y a peu de cellules immunitaires présentes au lieu de l'infection. Les AI concernent de nombreuses autres localisations (77) :

- atteintes cardiaques : endocardites, péricardites,
- atteintes hépatiques,
- atteintes rénales,
- atteintes thyroïdiennes (79),
- atteintes oculaires : endophtalmies,
- atteintes osseuses.

#### 4.2. Pronostic

Malgré une mortalité toujours importante, le pronostic des AI s'améliore (56) (80). La mortalité est passée de 60-70% (53) (56) à environ 30-40% (15) (52) (81) (80). Le pronostic est variable selon le site de l'infection, les pathologies sous-jacentes, le traitement antifongique, l'existence de co-infections et les résultats de la biologie. Les facteurs de bon pronostic identifiés sont :

- terrain sous-jacent :
  - o greffe de poumon (19),
  - o allogreffe avec cellules souches issues du sang périphérique (18),
- traitement :
  - o voriconazole seul ou en association (52),
- clinique :
  - o localisation sinusienne (82),
- biologique :
  - o plaquettes > 65 G/L et clairance de la créatinine > 53mL/min avant la période de neutropénie (18) (19) (83).

Les facteurs de mauvais pronostic sont :

- terrain sous-jacent :
  - o allogreffe de cellules souches (en l'absence de compatibilité HLA parfaite, sang de cordon et déplétion en cellules T) (59),
  - o infection par le VIH,
  - o greffe de foie (53) (82),
- traitement :
  - o corticoïdes à forte dose chez le patient greffé de cellules souches (59) (61),

- cliniques :
  - o infection disséminée (84),
  - o localisation cérébrospinale (52) (53) (82),
  - o présence d'un épanchement pleural (52),
  - o existence de pneumonies bactériennes intercurrentes (84),
  - o co-infection avec *Pneumocystis jirovecii* et/ou le cytomégalovirus (84),
  - o existence d'une GVHD (61),
- biologiques :
  - o neutropénie persistante (19) (59),
  - o persistance d'une CRP élevée (85),
  - o plaquettes < 65 G/L et clairance de la créatinine < 53 mL/min avant la période de neutropénie,
  - o positivité des cultures fongiques associées à des antigénémies positives (52).

#### 4.3. Prophylaxie et traitement curatif (86) (87)

##### 4.3.1. Traitement

##### 4.3.1.1. Médicamenteux

##### 4.3.1.1.1. Durée du traitement

Le traitement dure en moyenne 6 à 12 semaines pour les formes pulmonaires d'AI. Il doit couvrir la durée de l'immunodépression et la résolution des signes cliniques.

##### 4.3.1.1.2. Première intention

Le traitement de première intention de l'AI est le voriconazole intraveineux (IV) à la posologie de 6 mg/kg/12h le premier jour puis 4 mg/kg/12h les jours suivant. Le relai per os est possible. L'alternative thérapeutique est l'amphotéricine B liposomale à la posologie de 3 mg/kg par jour en IV.

##### 4.3.1.1.3. Sauvetage

En cas d'intolérance aux molécules de première intention ou de non réponse, un traitement de sauvetage est possible par d'autres molécules :

- posaconazole,
- caspofungine,

- micafungine.

#### 4.3.1.1.4. Associations

Les associations d'antifongiques ne sont pas recommandées en première intention. Elles restent possibles en traitement de sauvetage en cas d'AI réfractaire. Ces associations peuvent être :

- caspofungine et amphotéricine B,
- caspofungine et voriconazole.

#### 4.3.1.1.5. Résistances aux triazolés chez *A. fumigatus* (88)

La résistance aux antifongiques triazolés est apparue récemment chez *A. fumigatus* et augmente de manière importante ces dix dernières années. Le principal mécanisme de résistance est une mutation du CYP51A, gène codant pour la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase, cible des antifongiques triazolés. L'origine de l'apparition de cette résistance est multiple :

- elle concerne les patients recevant ces thérapeutiques au long cours dans le cadre d'aspergilloses chroniques,
- elle concerne des souches issues de l'agriculture où l'usage massif des antifongiques azolés a abouti à la sélection de souches résistantes.

La prévalence de cette résistance reste faible (aux alentours de 5% des souches isolées en santé humaine) mais le pronostic d'une AI à souche résistante est très mauvais (mortalité accrue).

#### 4.3.1.2. Non médicamenteux

Les principales mesures associées au traitement antifongique sont à la fois la diminution de l'immunosuppression (par la diminution des doses de corticoïdes) ou la récupération d'une neutropénie et la chirurgie.

La chirurgie n'est indiquée que dans certains cas :

- en cas de lésions pulmonaires proches de gros vaisseaux ou du péricarde,
- en cas d'hémoptysie avec un seul foyer infectieux,
- en cas de lésion extra-pulmonaire (par exemple atteinte du système nerveux central).



#### 4.3.2. Prophylaxie des AI en hématologie

##### 4.3.2.1. Médicamenteuse

Une prophylaxie antifongique primaire est possible par utilisation du posaconazole à la posologie de 200 mg trois fois par jour. Elle est indiquée chez les patients allogreffés avec GVHD chronique, chez les patients souffrant de LAM en induction (soit hors secteur protégé soit en secteur protégé mais réfractaire) et chez les patients traités par azacitidine. Cette prophylaxie primaire a pour objectif de limiter la survenue des IFI, de diminuer l'utilisation de traitements probabilistes et d'améliorer la survie globale du patient.

Une prophylaxie secondaire, pour les patients ayant eu une IFI au décours de leur pathologie, est possible par utilisation des antifongiques triazolés (voriconazole, itraconazole ou posaconazole) ou de l'amphotéricine B liposomale. Elle est indiquée chez les patients souffrant de LA (pendant les cures de chimiothérapie) et chez les patients allogreffés pendant au moins 6 mois et plus en cas de GVHD chronique. Cette prophylaxie secondaire limite les récurrences d'API et permet la poursuite du traitement anticancéreux.

##### 4.3.2.2. Non médicamenteuse

L'isolement du patient dans des chambres à atmosphère contrôlée (flux d'air laminaire, filtre HEPA...) permet de diminuer de manière très importante le nombre de spores aspergillaires présentes dans l'environnement. Un contrôle strict de l'alimentation évite également une exposition aux champignons responsables d'IFI.

## 5. Diagnostic des aspergilloses invasives

### 5.1. Critères de classification

Ces critères ont été élaborés par un groupe de travail international composé de membres de l'EORTC et du MSG et ont été publiés en 2002 (89) puis révisés en 2008 (90). Ils permettent de classer les AI en trois groupes : prouvée, probable et possible. Cette classification prend en compte des critères d'hôte, des critères cliniques, des critères radiologiques et des critères biologiques. Ces critères ne sont pas adaptés à toutes les populations pouvant développer des AI notamment les patients des soins intensifs sont exclus de cette classification. Ces critères sont détaillés dans l'annexe 1.

## 5.2. Diagnostic radiologique

Les lésions recherchées traduisent la physiopathologie de la maladie. Elles peuvent être simples ou multiples. Le scanner thoracique est préféré à la radiographie pulmonaire car plus sensible pour la détection des API précoces (50). Il est indiqué chez le patient neutropénique (depuis 10 à 14 jours) présentant une fièvre résistant aux antibiotiques et une symptomatologie pulmonaire.

### 5.2.1. Forme angioinvasive

#### 5.2.1.1. Signe du halo

Sur le scanner thoracique, les lésions traduisant le début d'une API se révèlent par le signe du halo (76) ; c'est un nodule ( $> 1$  cm en règle générale, correspondant au foyer infectieux) entouré par une plage en verre dépoli (correspondant à la limite entre les zones de thrombose et d'hémorragie). Il est présenté en figure 10. Ce signe doit être mis en évidence précocement en cas de suspicion d'AI car sa prévalence est divisée par cinq au bout d'une semaine d'infection.



Figure 10 : signe du halo chez un patient de 58 ans souffrant d'une API dans un contexte de LAM (d'après (91))

Chez le patient immunodéprimé, l'API est la principale cause de signe du halo. Cependant, il peut être observé dans d'autres situations pathologiques (92) :

- d'origine infectieuse :
  - o mycoses non aspergillaires : mucormycoses, candidoses, coccidiomycoses, cryptococcoses,
  - o tuberculose,
  - o pneumopathies bactériennes : *Rickettsia*, *Coxiella burnetti*,
  - o pneumopathies virales : HSV, VZV, CMV et myxovirus,
- d'origine néoplasique :
  - o tumeurs primaires (étiologie la plus fréquente de signe du halo chez le patient immunocompétent) : adénocarcinome pulmonaire, carcinome bronchiolo-alvéolaire, sarcome de Kaposi,
  - o métastases,
  - o lymphomes,
- autres causes :
  - o maladie de Wegener,
  - o poumon éosinophile.

#### 5.2.1.2. Signe du croissant gazeux

Les lésions traduisant une API ancienne se révèlent par le signe du croissant gazeux (présenté en figure 11); c'est un nodule contenant une poche d'air en forme de croissant entourant la zone de nécrose. Le signe du croissant gazeux apparaît tardivement avec la fin de la neutropénie : sa prévalence augmente avec le temps écoulé depuis le début de la maladie. Il ne peut donc pas être utilisé pour le diagnostic précoce d'une API mais sa visualisation au scanner thoracique est un signe de bon pronostic en règle générale (91), en dehors du cas où les lésions pulmonaires sont proches de gros vaisseaux (risque hémorragique majeur indiquant la chirurgie).

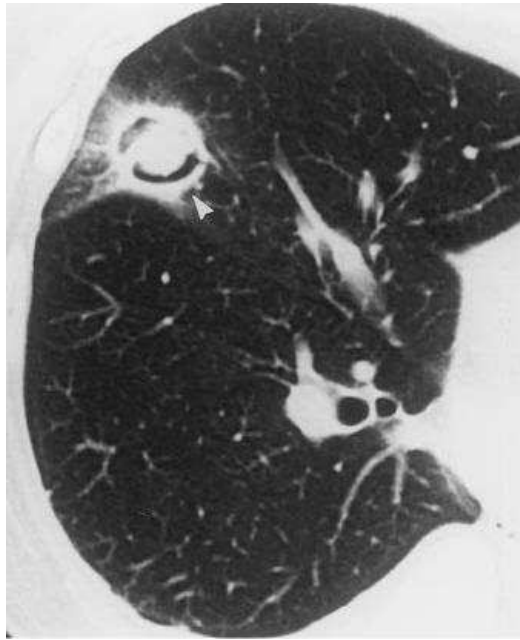


Figure 11 : signe du croissant gazeux chez le même patient, 4 jours après le signe du halo (d'après (91))

#### 5.2.2. Forme bronchoinvasive

L'aspect caractéristique est la présence de micronodules centrolobulaires associés à des « arbres en bourgeons » au scanner thoracique (76). Cette image est présentée en figure 12.

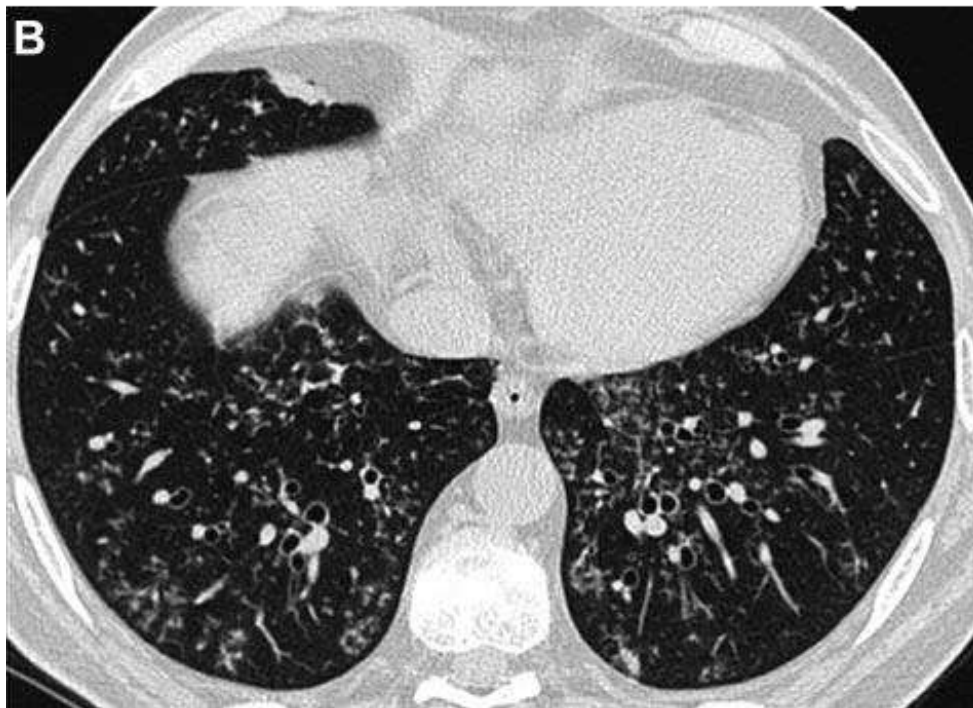


Figure 12 : arbres en bourgeons au scanner thoracique (d'après (76))

### 5.3. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique d'une AI, compte tenu du contexte immunologique ne peut se faire qu'à l'aide de méthode de diagnostic direct. En effet les réactions sérologiques à la recherche d'anticorps dirigés contre le champignon ne seront pas utiles voire ininterprétables chez des patients fortement immunodéprimés.

Le diagnostic direct prend alors plusieurs formes :

- mise en évidence du champignon directement dans les échantillons biologiques appropriés :
  - o culture et microscopie sur les liquides de lavage broncho-alvéolaires, broncho-aspiration, aspiration trachéale, crachats et autres prélèvements respiratoires ; d'autres prélèvements (cutanés, liquides de séreuses, selles) pourront également permettre l'isolement du champignon en fonction des localisations primaires et secondaires,
  - o histologie et culture sur biopsie tissulaire.
- mise en évidence du champignon par l'intermédiaire de ses composants :
  - o génomiques : diagnostic moléculaire par amplification du génome fongique,
  - o antigéniques : diagnostic direct par mise en évidence des antigènes de paroi des champignons.

#### 5.3.1. Culture et microscopie

La culture reste un outil important du diagnostic. En cas d'isolement d'un *Aspergillus* sp. issu d'un site normalement stérile, la culture apporte la preuve de l'infection ; elle permet également le diagnostic d'espèce et ensuite la réalisation d'un antifongogramme.

##### 5.3.1.1. Sur le sérum ou le sang total

Les hémocultures sont exceptionnellement positives en cas d'AI. Néanmoins, elles ont un intérêt pour le diagnostic différentiel des autres causes d'IFI chez les patients profondément immunodéprimés (candidose, fusariose, mucormycose) ainsi que des autres causes d'infections (93).

##### 5.3.1.2. Sur les prélèvements respiratoires

Les cultures sont réalisées sur l'ensemble des prélèvements respiratoires disponibles. Le rendement diagnostique est plus important dans le cadre de l'utilisation de milieux spécifiques pour l'isolement de champignons (94), mais la culture est possible sur des milieux classiques tels que la gélose au sang. Les cultures peuvent être faussement positives lors d'une contamination aérienne par des spores aspergillaires ce qui peut conduire à un diagnostic erroné chez des patients fortement immunodéprimés (93). Il est à noter une importante différence de sensibilité de la culture selon le contexte clinique (76). En effet, les aspergilloses bronchoinvasives seront fréquemment positives (83%) en culture tandis que les aspergilloses angioinvasives le seront plus rarement (18%). Ceci est facilement expliqué par la physiopathologie de ces formes. Dans les formes bronchoinvasives, le champignon se développe plus superficiellement au niveau de la muqueuse bronchique alors que dans les formes angioinvasives celui-ci a déjà envahi la circulation sanguine. Le champignon est donc plus accessible dans les formes bronchoinvasives. Il est important de combiner microscopie et culture car la microscopie, aussi simple et rapide soit-elle, améliore le rendement diagnostique de 15 à 20 % (95), notamment si le patient a reçu un traitement antifongique préalable. La microscopie directe ne permet pas un diagnostic de genre ou d'espèce, de nombreux champignons filamenteux pouvant donner le même aspect.

#### 5.3.1.3. Sur le liquide céphalo-rachidien

Comme pour les hémocultures, les cultures du LCR sont exceptionnellement positives (78). Une recherche mycologique sur le LCR est néanmoins indispensable en cas de signes neurologiques chez le patient.

#### 5.3.1.4. Conclusion

Avantages :

- permet le diagnostic d'espèce,
- permet la réalisation d'un antifongigramme,
- technique simple et peu coûteuse.

Inconvénients :

- technique de réalisation longue,
- technique très peu sensible sur prélèvements respiratoires (dans le cadre d'aspergilloses angioinvasives), sur le sérum ou le sang total et sur le LCR,

- difficulté pour différencier l'infection de la colonisation pour les sites non stériles.

### 5.3.2. Histologie

#### 5.3.2.1. Principe

L'analyse d'une biopsie tissulaire est un examen réalisé par les anatomo-pathologistes. Il consiste à mettre en évidence par un examen microscopique la présence du champignon. Le diagnostic de l'AI nécessite donc la mise en évidence de filaments mycéliens septés et ramifiés à 45° sur la biopsie, évocateurs de filaments aspergillaires (figure 13). Cet aspect n'est cependant pas spécifique d'*Aspergillus* spp. (77) Il peut notamment être retrouvé en présence de :

- *Scedosporium* spp.
- *Fusarium* spp.
- *Scopulariopsis* spp.

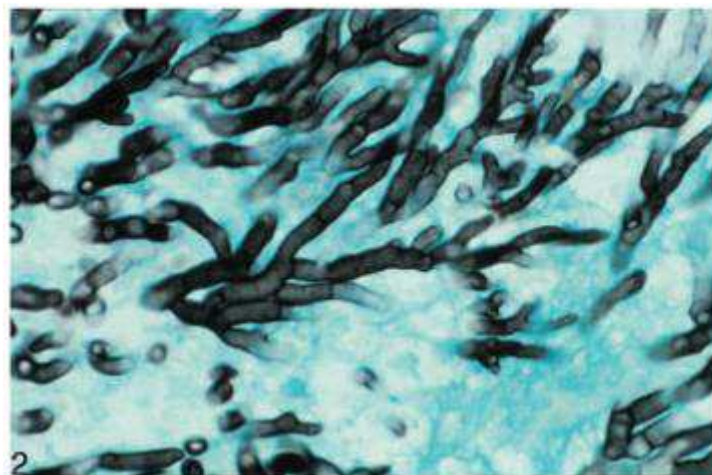


Figure 13 : mise en évidence de filaments d'*Aspergillus* spp. sur une biopsie tissulaire (coloration de Gomori) (d'après (96))

#### 5.3.2.2. Conclusion (97) (93)

Avantages :

- visualisation directe de l'agent pathogène,
- preuve de l'infection si l'échantillon provient d'un site normalement stérile.

Inconvénients :

- biopsie pulmonaire contre-indiquée chez les patients souffrant de thrombopénie et/ou d'hypoxie,
- pas de diagnostic de genre ni d'espèce, pas d'antifongogramme.

### 5.3.3. Antigène galactomannane

Le GM est un antigène de paroi fongique qui est libéré dans la circulation sanguine lors d'une AI (98). Il peut être recherché et dosé par une technique ELISA commercialisée par Bio Rad® appelée « Platelia *Aspergillus* ».

#### 5.3.3.1. Sur le sérum

##### 5.3.3.1.1. Cinétique

Le relargage de GM dans le sang se fait au cours de la croissance du champignon dans l'organisme (99). Grâce à un modèle expérimental reproduisant les alvéoles pulmonaires (100), il a été démontré que le moment de l'apparition du GM dans le sang correspond exactement au moment de l'invasion du compartiment vasculaire par le champignon après passage de la barrière endothéliale. Le GM seul ne peut traverser les barrières épithéliales : les compartiments sanguins et pulmonaires sont donc distincts. Il est donc important de rechercher le GM dans ces deux compartiments indépendants. La clairance de l'antigène dans le sang est rapide (101) ce qui implique de répéter les dosages fréquemment (deux fois par semaine en moyenne).

##### 5.3.3.1.2. Apport diagnostique

L'antigénémie GM est considérée comme un critère diagnostique d'AI dans la classification révisée des AI de l'EORTC/MSG (90). Sa positivité doit être interprétée en fonction des facteurs d'hôte, de la clinique et de l'imagerie. Les performances diagnostiques de l'antigénémie GM dépendent largement des populations étudiées. Une méta-analyse (102) fait état de ces performances, dont les principales conclusions sont présentées dans le tableau II. L'antigénémie permet cependant un diagnostic précoce des AI (103) avec une positivité dans 67% des cas avant la présence de signes au scanner thoracique.

#### ➤ Populations non hématologiques

Comme indiqué par la méta-analyse, les performances (et notamment la sensibilité) sont moins intéressantes dans les populations ne souffrant pas de pathologie hématologique avec



une sensibilité inférieure à 50% qui peut retarder le diagnostic : ceci est expliqué par une angioinvasion moins marquée chez ces patients (en lien avec une neutropénie moins importante (52)), n'aboutissant pas à un relargage sérique de GM. Certains auteurs (104) ne recommandent pas le suivi par GM sérique des patients transplantés d'organes en raison de cette faible sensibilité. D'autres auteurs recommandent de revoir les critères de classification pour ces populations (52).

#### ➤ Population pédiatrique

Les performances du GM dans le sérum sur les populations pédiatriques semblent équivalentes à celles observées chez les adultes (105) avec une bonne sensibilité en cas de pathologies hématologiques et une faible sensibilité en dehors des contextes hématologiques (notamment en cas de granulomatose septique chronique). La spécificité apparaît cependant inférieure que chez l'adulte notamment en raison de cas de translocation digestive de GM plus fréquents chez l'enfant (106) (107).

#### 5.3.3.1.3. Apport pronostique

L'antigénémie est également un marqueur pronostique :

- il indique un mauvais pronostic en cas de résultat initialement élevé (108)
- il suit la progression clinique de l'AI (109) : une régression des taux de GM est corrélée avec une meilleure survie des patients atteints d'AI (108)
- il permet de distinguer une aggravation d'une AI (augmentation de l'antigénémie) d'un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (diminution de l'antigénémie), pourtant cliniquement proche (93).

#### 5.3.3.1.4. Limites

##### ➤ Faux négatifs

L'antigénémie GM peut rester négative dans les populations non neutropéniques, ceci étant lié à la physiopathologie de la maladie chez ces patients. Dans les AI bronchoinvasives, le GM n'est pas systématiquement retrouvé dans le sang, ceci étant lié au fait qu'il n'y a pas de passage de GM entre les compartiments pulmonaire et sanguin (100). Cette hypothèse est confirmée par la méta-analyse (102) où l'antigénémie GM présente une faible sensibilité chez les patients transplantés d'organe.

Performances	Populations étudiées			
	Globale	Pathologies hématologiques	Patients greffés de moelle osseuse	Patients transplantés d'organes solides
<i>Cas d'AI prouvées</i>				
<b>Sensibilité</b>	71%	70%	82%	22%
<b>Spécificité</b>	89%	92%	86%	84%
<i>Cas d'AI prouvées ou probables</i>				
<b>Sensibilité</b>	61%	58%	65%	41%
<b>Spécificité</b>	93%	95%	65%	84%

Tableau II : performances de l'antigénémie GM selon les populations étudiées (d'après (102))

Ceci est également observé dans les populations pédiatriques non neutropéniques (105) et reporté dans des publications ayant étudié les facteurs influençant les performances du test (110).

L'antigénémie peut également être négative ou se négativer en cas de prophylaxie ou de traitement antifongique (110) (111) en raison d'une diminution de la charge fongique et d'une progression limitée de la maladie sous traitement antifongique. Des effets paradoxaux ont été observés sur des rats traités par échinocandines (112) : un accroissement du taux de GM est observé sous traitement en raison d'une fragmentation du champignon.

➤ Faux positifs

L'existence de nombreux faux positifs diminue fortement la spécificité de ce test diagnostic. En effet, le GM n'est pas spécifique d'*Aspergillus* spp. et le test peut se positiver dans les cas suivants :

- traitement par certains antibiotiques d'origine fongique :
  - o l'association pipéracilline-tazobactam représente la plupart des cas (113), même si des publications récentes (114) (115) font part d'une possible disparition de ces cas de faux-positifs suite à une modification probable dans la fabrication de ce médicament,
  - o l'ampicilline (116) ou l'association amoxicilline-acide clavulanique (117) sont parfois mises en cause,
- infections invasives liées à d'autres champignons libérant du GM (ou un antigène proche) dans le sang :
  - o histoplasmoses (118),
  - o cryptococcose et pénicilliose disséminées (119),
  - o infections disséminées à *Geotrichum* spp. et *Trichosporon* spp. (120),
- perfusion de solutions glucosées (telles que le « Plasma-Lyte ») contenant du gluconate de sodium (121),
- transfusion de plasma frais congelé ou de concentrés plaquettaires sur certains types de poches (122),
- translocation digestive de GM d'origine alimentaire en cas d'altération des muqueuses :
  - o alimentation lactée chez le jeune enfant (105) (106),

- o consommation de glaces à l'eau (123),
- o consommation de riz, de pâtes, de plats préparés d'origine hospitalière (124).

➤ Libération espèce- et progression-dépendante

La positivité de ce marqueur dans le cadre d'une AI peut dépendre de l'espèce responsable de l'infection. En effet, la libération de GM est espèce-dépendante et est par exemple plus faible en cas d'infection à *A. fumigatus*. La sensibilité est donc diminuée en cas d'AI à *A. fumigatus* (125). De plus, la sensibilité diagnostique peut être altérée selon le degré d'immunodépression ce qui conduit à une invasion plus ou moins importante de l'*Aspergillus* sp. et donc à une libération plus ou moins importante de GM dans le sang.

➤ Faible reproductibilité analytique

Sur un plan purement technique, le test n'a qu'une faible reproductibilité : il a été montré que jusqu'à 55% des résultats trouvés positifs sur un premier passage sont contrôlés négatifs sur un deuxième passage (126).

#### 5.3.3.2. Sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire

L'antigène dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire est un excellent marqueur diagnostic, il présente une sensibilité de 87% et une spécificité de 89% (127).

#### 5.3.3.3. Sur le liquide céphalo-rachidien

La recherche d'antigène GM peut être réalisée sur le LCR. En effet, il existe une synthèse intrathécale de GM lors d'aspergilloses cérébro-spinales (128). Ce marqueur est très précoce (en moyenne positif 45 jours avant la culture) et assez spécifique (129). La décroissance des taux de GM dans le LCR est également corrélée avec une évolution clinique favorable.

### 5.3.4. Antigène (1→3)-β-D-glucane

#### 5.3.4.1. Généralités (130)

Un autre composant de paroi, le (1→3)-β-D-glucane (BG) est également utilisé dans le diagnostic biologique des AI. Le BG est un composant de la paroi de la plupart des champignons responsables de pathologies humaines (dont *Aspergillus* spp.) à l'exception de *Cryptococcus neoformans* et des zygomycètes : il n'est donc pas spécifique d'une pathologie

fongique invasive déterminée. Le dosage dans le sérum est réalisé grâce à des méthodes utilisant des cascades de coagulation d'origine animales.

#### 5.3.4.2. Cinétique

Lors d'AI, le champignon en phase de croissance est capable de libérer du BG dans le sérum, avec une cinétique semblable au GM (131). Cependant, le BG peut rester positif longtemps chez des patients guéris (132), ne trouvant pas d'intérêt dans l'évaluation de la réponse thérapeutique ou du pronostic, au contraire du GM. Il pourrait cependant trouver un intérêt dans le diagnostic des AI en cas de négativation rapide du GM par traitement.

#### 5.3.4.3. Faux positifs (130)

Comme le GM, il existe de nombreuses causes de faux positifs dans le dosage des BG :

- patients hémodialysés sur membrane de cellulose ou apparentée,
- injection intraveineuse d'immunoglobulines, d'albumine ou d'autres médicaments dérivés du sang préparés industriellement,
- amoxicilline-acide clavulanique par voie intraveineuse,
- utilisation de gazes dans des contextes chirurgicaux.

#### 5.3.4.4. Apport diagnostique

Le dosage des BG est considéré comme un critère diagnostique d'AI dans la classification révisée des AI de l'EORTC/MSG (90). Sa positivité doit être interprétée en fonction des facteurs d'hôte, de la clinique, de l'imagerie et du résultat du GM car le manque de spécificité pour une espèce fongique complique l'interprétation. Les principales performances dans le diagnostic des AI ont été évaluées par le biais d'une méta-analyse récente (133). La sensibilité diagnostique est de 77% et la spécificité de 83%. Cependant, ces résultats méritent d'être évalués sur les différentes populations à risque d'AI car, comme pour le GM, nous pouvons suspecter d'importantes variations de sensibilité et spécificité en fonction du terrain.

#### 5.3.5. Antigène glycoprotéine extracellulaire

Récemment, un test immuno-chromatographique (présenté en figure 14) spécifique de l'*Aspergillus* sp. a été développé (134). Il permet la détection d'une glycoprotéine extracellulaire sécrétée uniquement en phase de croissance directement dans le sérum ou dans

le LBA. Les principaux avantages de ce test sont la simplicité et la rapidité d'exécution. Les performances sur sérum atteignent celles du GM en terme de sensibilité et de spécificité chez le patient allogreffé de cellules souches (135) présentant même une meilleure précocité de détection des AI (136). Les performances sur LBA ont également été évaluées (137) et présentent une excellente sensibilité de 100% et une spécificité de 81% pour des patients atteints d'AI dans une population de pathologies hématologiques et de transplantations d'organes solides. L'utilisation d'antibiotiques (tels que la tazocilline) et les spores aspergillaires ne sont pas responsables de faux positifs (134).

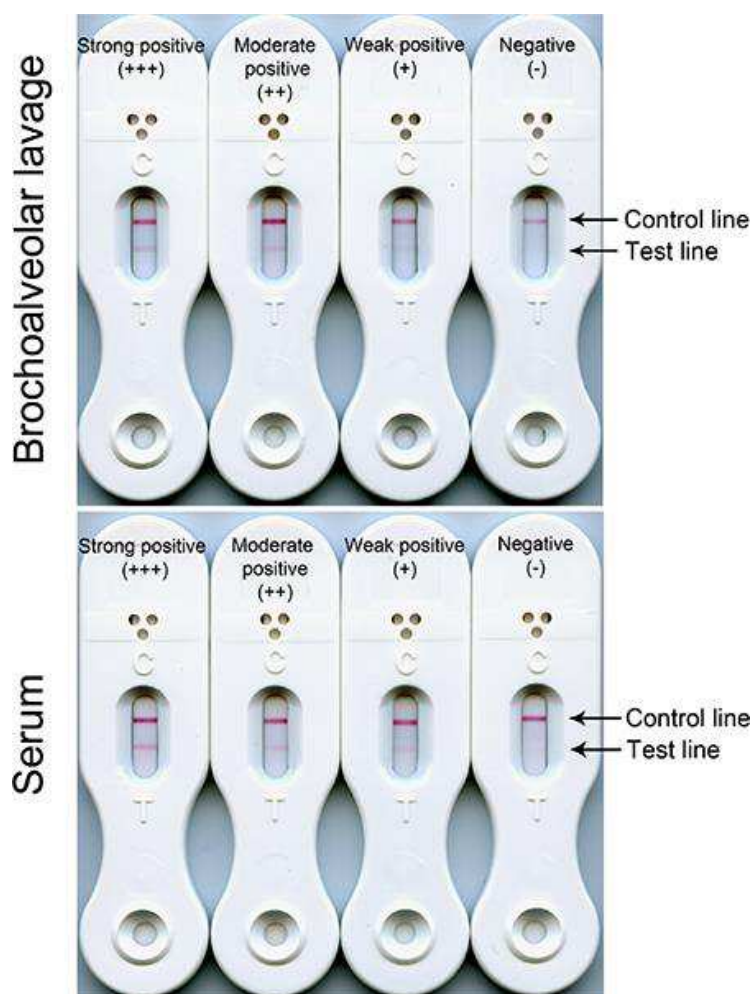


Figure 14 : exemples de résultats du test immuno-chromatographique spécifique d'*Aspergillus* spp. (d'après (138))

## 6. Apport des techniques moléculaires

### 6.1. Principe

Les techniques moléculaires sont utilisées pour mettre en évidence la présence d'ADN fongique chez le patient au sein de différents prélèvements tels que le sang (sérum, plasma,

sang total), les prélèvements respiratoires (expectorations, BA, LBA) ou encore le liquide céphalo-rachidien.

#### 6.1.1. Génome d'*Aspergillus fumigatus* et cibles potentielles

Le génome d'*A. fumigatus* est situé sur 8 chromosomes et représente une taille d'environ 29 Mb (139). Les cibles mitochondriales et ribosomales sont les plus intéressantes car le nombre élevé de répétition des gènes est favorable à la sensibilité de la technique moléculaire. Les cibles les plus couramment utilisées sont décrites dans le tableau III.

Cibles utilisables	Nombre de répétitions par génome
ARN ribosomal 5,8S	
ARN ribosomal 18S	10 à 100 copies, selon la souche (140) (141)
ARN ribosomal 28S	
Mitochondrial	12 (139)

Tableau III : récapitulatif des principales cibles utilisées pour la PCR *Aspergillus* spp.

Récemment (142), une PCR ciblant le gène codant pour l'hémolysine d'*A. fumigatus* (aspHS) a été mise au point. Le principal intérêt est que le gène est hyperexprimé en cas d'AI et l'utilisation d'une telle cible de PCR permettrait de distinguer les infections véritables des contaminations par des spores.

#### 6.1.2. Différentes techniques d'analyse

Différentes approches techniques peuvent être envisagées :

- la PCR fongique universelle suivie d'une amplification du produit de PCR par des sondes spécifiques (143) : cette approche très sensible est néanmoins peu spécifique (présence de nombreux faux positifs) (140),
- la PCR nichée (144), étant la résultante de deux PCR consécutives, est intéressante en termes de sensibilité diagnostique mais il existe un risque important de faux positifs en raison de contaminations lors de la première étape d'amplification,
- la PCR quantitative en temps réel, qui semble désormais largement adoptée dans les publications récentes (145) (146), présente de nombreux avantages :
  - o il est possible de suivre la réaction au cours de sa réalisation,

- o les réactions s'effectuent en tubes fermés ce qui limite le risque de contaminations,
- o l'ADN détecté dans l'échantillon peut être quantifié par comparaison à une gamme de concentration connue (avec possibilité d'établir un seuil de pathogénicité sur les LBA ou encore de suivre l'évolution de l'infection après une prise en charge thérapeutique).

En cas d'utilisation de la PCR quantitative en temps réel, il existe plusieurs méthodes de détection de l'amplification de l'ADN fongique :

- marquage par SYBR Green : ce marquage non spécifique de l'ADN amplifié ne devrait plus être utilisé,
- utilisation de sondes d'hydrolyse,
- utilisation de sondes d'hybridation.

## 6.2. Sur un prélèvement sanguin

### 6.2.1. Choix de l'échantillon

Les échantillons possibles sont le sérum, le plasma EDTA et le sang total EDTA. Ces différents milieux ne présentent pas les mêmes performances analytiques. En effet, le plasma EDTA apparaît moins performant que le sang total (147) à volume extrait équivalent (1 mL) : ces différences peuvent être expliquées par les techniques d'extraction mais aussi par la présence d'ADN fongique dans les leucocytes. Il a été par contre démontré que le sérum possède des performances analytiques semblables au sang total EDTA (148) avec des avantages intéressants par rapport au sang total :

- possibilité d'utiliser le même échantillon pour tester l'antigène GM et la PCR,
- standardisation des procédures d'extraction sur sérum ; de plus les extractions de sang total étant complexes, il existe un risque accru de contamination par des spores aspergillaires sur ce type d'échantillon,
- conservation facile du sérum sous forme d'aliquots congelés,
- pas de risque d'inhibition de la PCR par l'EDTA.

Le volume de sérum extrait présente également une importance cruciale en cas d'utilisation de ce milieu pour la PCR (149) : il a été démontré un accroissement de la sensibilité et de la



valeur prédictive négative (sans modification de la spécificité et de la valeur prédictive positive) par l'extraction de 1 mL de sérum par rapport à une extraction de 100 µL de sérum.

#### 6.2.2. Stabilité

L'ADN d'*A. fumigatus* est stable dans le sérum ou le sang total jusqu'à 144 heures à 37°C (99). Une publication (150) recommande cependant un traitement rapide de l'échantillon pour éviter une dégradation enzymatique de l'ADN.

#### 6.2.3. Cinétique

L'ADN d'*A. fumigatus* peut être libéré (probablement sous forme libre (151)) dans le sérum dans deux circonstances :

- lors de la phase de croissance du champignon au cours de la formation de biofilms,
- lors de la phase stationnaire avec lyse fongique (par apoptose ou sous l'action du système immunitaire) (99).

Le relargage d'ADN est corrélé avec la biomasse fongique : plus celle-ci est importante, plus la quantité d'ADN détectable l'est. Bien que le relargage lors de la phase de croissance reste controversé, deux études se contredisant (99) (151), il est admis que l'ADN fongique n'est détectable qu'après le GM. Il a été cependant observé de véritables cas d'AI où le GM reste négatif dans le sérum (152).

#### 6.2.4. Apport diagnostique

En raison d'un manque de standardisation (diversité des cibles moléculaires, des techniques d'amplification, des techniques d'extraction), la PCR n'est pas un critère diagnostique actuellement retenu par la classification révisée de l'EORTC/MSK (90). Une méta-analyse (153) regroupant 16 publications centrées sur la PCR *Aspergillus* spp. a évalué l'apport de la PCR dans le diagnostic des AI. La population étudiée est principalement composée de patients atteints de pathologies hématologiques et ayant reçu une chimiothérapie ou ayant reçu une greffe de cellules souches. Les patients souffraient d'AI probables ou certaines selon les critères de l'EORTC. Les techniques utilisées sont très variables (tant au niveau des cibles, de la présence d'un contrôle interne (CI) ou non, de la méthode d'extraction ou d'amplification).

Les principales conclusions de cette méta-analyse sont :

- le rapport des cotes diagnostiques moyen (valeur qui représente la force de l'association entre la maladie et le résultat du test) est de 16 ce qui confirme que la PCR est un test qui permet de diagnostiquer les AI,
- un seul résultat positif pris en compte : Se 75% et Sp 87%,
- deux résultats positifs pris en compte : Se 88% et Sp 75%,
- pour les auteurs, un seul résultat négatif est suffisant pour exclure une AI (ainsi un suivi de patient par PCR peut être envisageable) tant que la prévalence de l'AI reste faible dans le centre (< 10%),
- deux résultats positifs sont nécessaires pour confirmer l'AI (augmente la spécificité du test).

Les principales limitations de la méta-analyse sont :

- une seule population étudiée (patients souffrant de pathologies hématologiques),
- les performances de la PCR sont calculées à partir d'études publiées (biais de publication : les mauvais résultats n'ont pas été publiés),
- hétérogénéité dans les techniques de PCR et les cibles,
- pas d'analyse de la combinaison avec un autre marqueur sérique tel que le GM.

#### ➤ Interprétation des résultats de PCR

Selon les centres, l'interprétation des résultats est différente : soit un seul test positif suffit à considérer le patient positif, soit 2 sont nécessaires (153). La différence tient surtout en la modification des sensibilités et spécificités des tests selon la stratégie adoptée.

#### 6.2.5. Apport pronostique

Une étude (108) portant sur l'intérêt des biomarqueurs dans le pronostic des AI n'a pas démontré de lien entre l'évolution de la charge fongique (estimée par PCR) et le pronostic de l'AI.

#### 6.2.6. Faux positifs

- Contamination de laboratoire par des spores aspergillaires (réactifs ou sérum, lors de l'extraction ou de la préparation du mix) ou par de l'ADN amplifié lors d'expériences précédentes (154)

- Contamination d'antibiotiques intraveineux par de l'ADN fongique (155)
- Translocation digestive d'ADN fongique (156) :

Un cas de translocation digestive a été démontré chez un patient atteint de GVHD avec une mucite importante. Une translocation de GM et d'ADN aspergillaire ont eu lieu depuis le tube digestif suite à l'ingestion d'un complément alimentaire (Scandishake® Mix) : ce complément alimentaire contenait effectivement du GM et de l'ADN mais aucune particule viable n'a été mise en évidence (les cultures sont restées négatives). Il s'agit donc d'une réelle translocation digestive de particules non viables présentes préalablement dans le complément alimentaire (et non d'une contamination par des conidies). Ce résultat ne remet pas en question l'hypothèse diagnostique principale en cas de résultat double positif chez un patient suspect d'AI mais cette éventualité doit être envisagée en cas de supplémentation alimentaire chez un patient sans atteinte clinique.

### 6.3. Sur le liquide de lavage broncho-alvéolaire

La PCR peut être réalisée sur divers prélèvements respiratoires (LBA, BA et expectorations). Elle permet un diagnostic beaucoup plus précoce que la culture fongique (délai de rendu < 4h contre 3 jours pour la culture) (157). Cependant ce gain en précocité doit être pondéré par la capacité du laboratoire à répondre aux demandes d'examens. Une méta-analyse publiée en 2012 (158) annonce des résultats excellents de la PCR sur le LBA. Cette analyse a, rétrospectivement à partir de 19 publications, étudié l'intérêt de l'apport de la PCR au diagnostic d'AI chez les patients à risque, en comparaison avec le GM seul ou en association avec lui. Les auteurs rapportent une sensibilité moyenne de 90% (allant de 43 à 100%) et une spécificité moyenne de 96% (allant de 87 à 100%). La sensibilité semble être diminuée par le traitement antifongique. La large dispersion des résultats peut s'expliquer par les différentes techniques utilisées (PCR classique, nichée ou en temps réel, avec CI ou non). Les auteurs concluent en une supériorité de la PCR par rapport au GM pour un *cut-off* de celui-ci de 0,5. L'association de la PCR et du GM augmente la sensibilité diagnostique sans affecter la spécificité. Sur le LBA, un résultat négatif de PCR ou de GM exclut une AI avec une haute probabilité (> 98%).

Les résultats de cette méta-analyse sont largement contredits par une étude très récente (159). En effet, réalisée pour la première fois sur une grosse cohorte de patients immunodéprimés à risque d'AI, elle ne montre pas d'apport important de la PCR dans le diagnostic de l'AI. La sensibilité est faible (26%) tandis que la spécificité est acceptable (70%). Les auteurs justifient leurs résultats par divers facteurs influençant la PCR sur le LBA qui nécessitent d'être connus afin de mieux interpréter un résultat négatif en situation réelle :

- les traitements antifongiques déjà initiés au moment du prélèvement diminuent la sensibilité : dans leur étude, 60% des patients étaient traités, ces données manquant dans les précédentes études, leurs résultats de sensibilité peuvent être remis en question,
- les nouveaux traitements et protocoles de prophylaxie étant plus efficaces que ceux utilisés au moment des précédentes études, ils diminuent d'autant plus la charge fongique extravasculaire et donc la sensibilité de la PCR.

Les patients n'étaient pas sélectionnés par des signes pulmonaires (clinique ou imagerie) dans cette étude à l'inverse des études précédentes ce qui implique une diminution artificielle de la sensibilité en raison d'un nombre plus important de patients indemnes d'AI. De plus, leurs patients appartenaient à tous les groupes diagnostiques d'AI (prouvée/possible, probable) et les patients pouvaient également souffrir de mycoses invasives non aspergillaires. Autant de facteurs qui peuvent diminuer la sensibilité diagnostique d'une PCR spécifique d'*Aspergillus* spp. sur le LBA.

#### 6.4. Sur le liquide céphalo-rachidien

La PCR sur le LCR a été évaluée de manière complète en 2013 (78). La technique utilisée était une PCR nichée spécifique du genre *Aspergillus* spp. (séquence dérivée du gène codant pour le rRNA 18S d'*A. fumigatus*). L'extraction était réalisée sur 1 mL de LCR et un CI a été utilisé. La cohorte étudiée comprenait 30 patients avec une aspergillose cérébrospinale (8 prouvées/probables et 22 possibles) et un groupe de 25 patients non atteints d'aspergillose cérébrospinale était utilisé comme contrôle. Les performances observées lors de cette étude sont excellentes. La sensibilité diagnostique est de 100% et la spécificité de 93%. Ces résultats doivent être cependant interprétés avec prudence en regard de la technique utilisée (PCR nichée) qui peut présenter un nombre non négligeable de faux positifs et qui n'est désormais plus recommandée (160). La PCR utilisée sur le LCR semble malgré tout être un

excellent marqueur diagnostique de l'aspergillose cérébro-spinale. Par ailleurs, dans cette analyse, la sensibilité de la PCR est meilleure que l'antigène GM ce qui vient conforter les résultats obtenus en 1999 par Kami (161) sur un faible nombre de patients.

# Matériel et méthodes

## 1. Choix du prélèvement et de la technique d'extraction

Dans notre étude, le choix du milieu d'extraction s'est porté sur le sérum (1 mL). Ce milieu possède des performances équivalentes au sang total avec des avantages intéressants par rapport à celui-ci (en termes de praticité) (148). La sensibilité sur le sérum est optimale pour des volumes extraits d'1 mL (149). Cet échantillon permet d'utiliser des techniques automatisées d'extraction de l'ADN qui limitent le risque de contamination des échantillons et des réactifs par des spores aspergillaires. La technique utilisée est celle du « MagNA Pure » de Roche Diagnostics, avec le kit « MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume » adapté à l'extraction de volumes importants. Le volume d'élution est fixé à 50  $\mu$ L, ce qui est en accord avec les recommandations européennes (160). Le principe de l'extraction est décrit en figure 15.

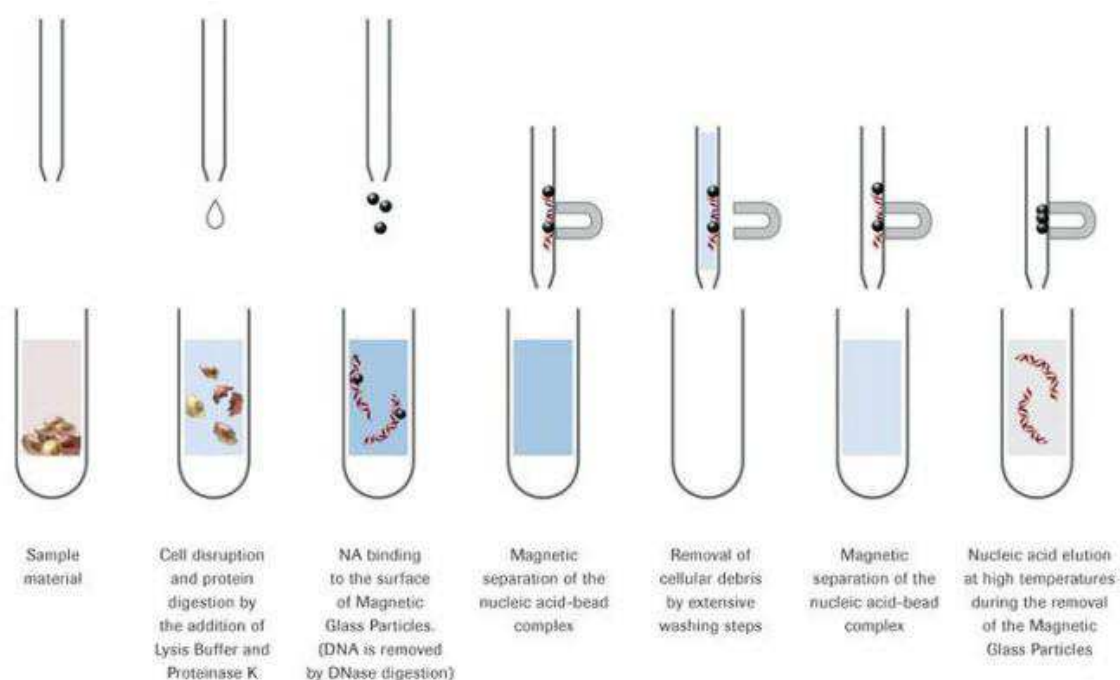


Figure 15 : principe de l'extraction d'ADN sur le MagNA Pure (Roche Diagnostics)

## 2. Choix de la technique d'amplification et de la cible

Le choix de la technique d'amplification s'est porté sur une PCR en temps réel, technique faisant actuellement référence dans la pratique clinique quotidienne en raison de ses

nombreux avantages (rapidité, simplicité, robustesse) et également en terme de performances (quantification, sensibilité, spécificité) (146). L'appareil utilisé au laboratoire est un « LightCycler 2.0 » de Roche Diagnostics. Le kit de PCR utilisé est le « LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe ». La détection de l'amplification est réalisée par sonde d'hydrolyse, dont le principe est expliqué en figure 16.

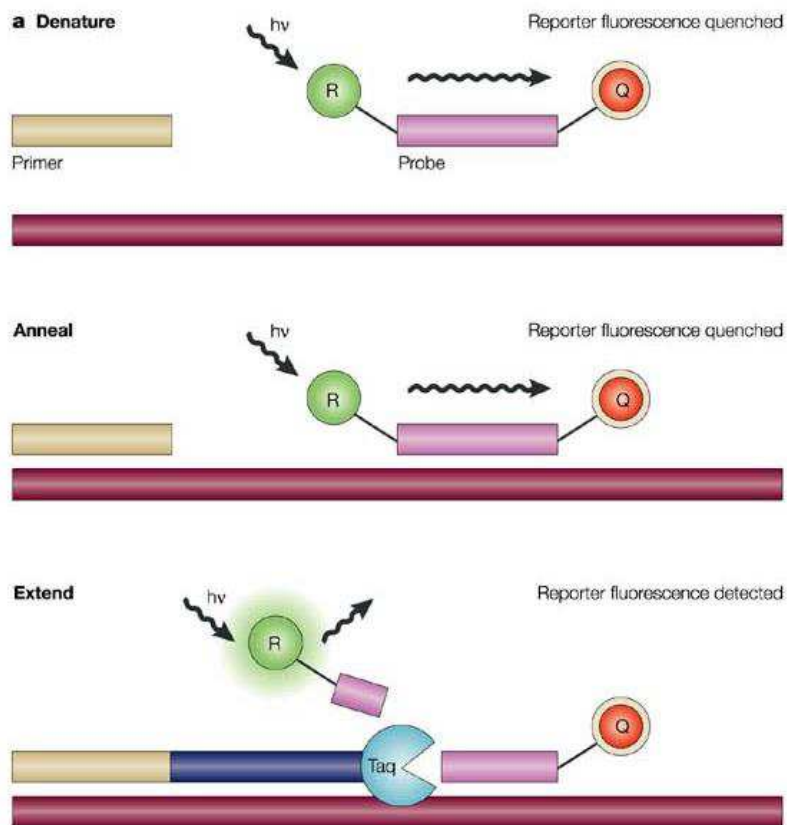


Figure 16 : principe de fonctionnement d'une détection par sonde d'hydrolyse

- étape de dénaturation, la fluorescence du *reporter* est absorbée par le *quencher* : il n'y a aucune émission de fluorescence
- étape d'hybridation : même situation
- étape d'élongation au cours de laquelle la TAQ polymérase hydrolyse la sonde, libérant ainsi le *reporter* de son *quencher* : il y a émission de fluorescence et détection par l'appareil de PCR

Le  $C_t$  (ou « crossing threshold ») appelé également  $C_p$  (ou « crossing point ») correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires afin que le signal détecté soit significativement supérieur au bruit de fond. La figure 17 présente une courbe d'amplification « type » de PCR en temps réel.

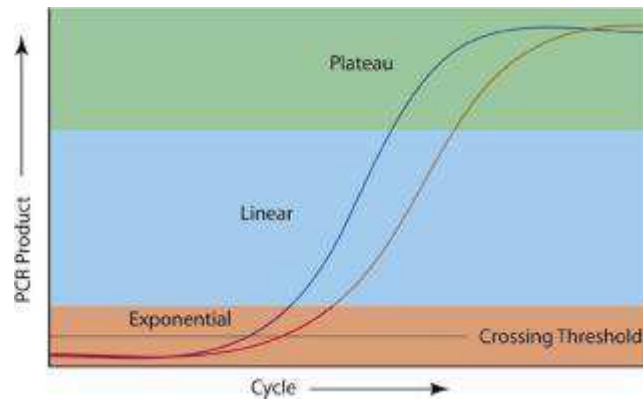


Figure 17 : représentation d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel (d'après (162))

La cible choisie est l'ARNr 28S spécifique d'*A. fumigatus*. Le fragment amplifié fait 68 paires de bases, de séquence :

« CTCGGAATGTATCACCTCTCGGGGTGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGGCCT  
GCCTGGACCGAGGA ».

Les amorces utilisées sont :

- Amorce sens : 5'-CTCGGAATGTATCACCTCTCGG-3'
- Amorce antisens : 5'-CCTGCCTGGACCGAGGA-3'

La détection est faite par une sonde d'hydrolyse qui émet à 530 nm en cas d'amplification positive : 5'-FAM-TGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCG-TAMRA-3'.

Cette cible possède plusieurs avantages :

- Très spécifique de l'espèce la plus souvent responsable d'AI (15) (16)
- Fait partie d'une région répétée du génome aspergillaire (139)
- A montré de bons résultats dans des études antérieures (145) (149) (163)

### 3. Mise au point de la méthode

#### ➤ Gamme de concentration d'ADN d'*A. fumigatus*

La gamme de concentration a été préparée à partir de solution mère d'ADN contenant la séquence cible. Cette solution mère avait été préparée antérieurement par clonage de la cible à l'aide du kit TOPO TA Cloning®, extraction de l'ADN plasmidique et dosage de la concentration d'ADN à l'aide du NanoDrop® 2000. A l'aide de dilutions successives dans un tampon adapté à la conservation des acides nucléiques, nous avons obtenu les points de



gamme suivants :  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  et  $10^1$  copies du gène cible par  $\mu\text{L}$ . Cette gamme a été testée en PCR puis sauvegardée comme référence dans le logiciel. Ainsi, pour obtenir la quantification lors du passage de patients, il suffit de n'utiliser qu'un point de gamme (le  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ) qui permet une calibration par rapport à la gamme précédemment sauvegardée.

➤ Optimisation des conditions de PCR en temps réel

La concentration en  $\text{MgCl}_2$  peut faire varier la spécificité et la sensibilité de la PCR pour sa cible dans le milieu. Une concentration inadaptée peut aboutir à des faux positifs ou des faux négatifs. Différentes concentrations ont été testées, selon les recommandations du kit de PCR « LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe » de Roche Diagnostics. Les concentrations testées, soit 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM et 3,5 mM, ont permis d'aboutir au choix de la concentration de 2,5 mM qui est la première concentration avant la perte de sensibilité due à une concentration trop basse ne permettant pas une réalisation correcte de la PCR. Les résultats de cette optimisation sont présentés en figure 18.

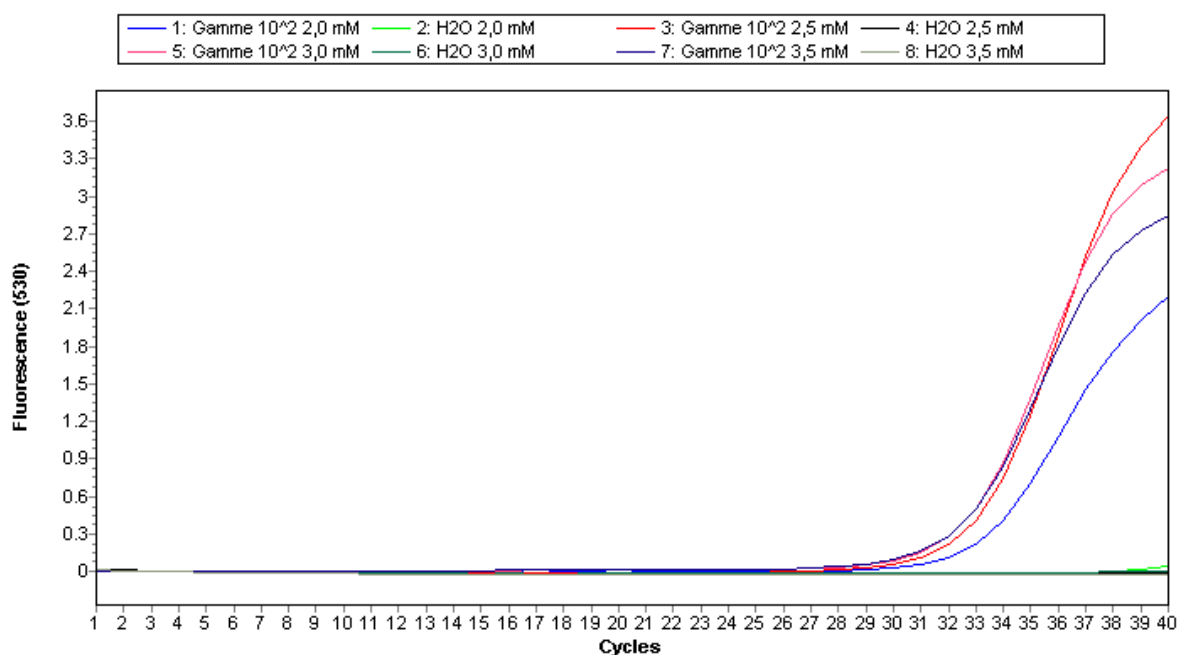


Figure 18 : optimisation de la concentration en  $\text{MgCl}_2$

➤ Mise au point du contrôle interne

L'utilisation d'un CI permet de valider le résultat de la PCR pour chaque patient en tant que contrôle d'extraction et d'inhibition. L'utilisation d'un CI est recommandée (160) pour la réalisation de PCR dans le diagnostic des AI. Le CI utilisé correspond à de l'ADN de phage phiX174 commercialisé par Argene®.

Les amorces utilisées sont :

- amorce sens : 5'-TCAGCAAACGCAGATCAG-3',
- amorce antisens : 5'-GTTCCAAGTATCGGCAACAG-3'.

Les concentrations d'amorces ont été optimisées et réduites au minimum imposé par le kit « LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe » soit 0,2 µM. La détection de l'amplification du CI est faite par une sonde d'hydrolyse qui émet à 610 nm : 5'-TEXAS-TCTAATGTCGTCAGTCTGCTTCT-BHQ<sub>2</sub>-3'. Le C<sub>t</sub> du CI doit être 30 ± 1,5 (déterminé statistiquement sur 31 passages de contrôle interne par des opérateurs différents à des jours différents, en l'absence d'inhibition suspectée) pour être validé. Si le C<sub>t</sub> obtenu est situé en dehors de ces limites, une inhibition de la réaction par une substance interférente est fortement suspectée.

## **4. Rédaction des procédures et formation des techniciens**

Les différentes étapes techniques de la PCR sont détaillées dans 3 procédures disponibles en annexe 2. Le passage de la technique en routine a nécessité un transfert de compétences de l'interne vers les techniciens du laboratoire de parasitologie-mycologie. La formation s'est déroulée en deux sessions de 3h : un tutorat passif (l'interne réalise une technique complète – extraction, amplification et analyse – devant la technicienne qui suit le déroulement à l'aide des procédures) puis un tutorat actif (la technicienne réalise la technique complète en présence de l'interne qui la surveille et juge son travail).

## **5. Interprétation d'un résultat positif**

Dans notre méthode, un résultat est considéré comme positif si, dans les conditions définies dans le programme d'analyse :

- une amplification significative (signal supérieur au bruit de fond) est détectée dans le canal « 530 nm »
- et l'aspect de la courbe d'amplification est conforme à celui obtenu lors d'une réaction normale (aspect sigmoïde ou, à défaut en cas d'amplification tardive, aspect initial de type « exponentiel »)
- et en l'absence d'inhibition de la réaction de PCR (le  $C_t$  du contrôle interne est conforme au résultat attendu dans des conditions de réaction sans inhibition de la PCR).

A l'aide de la gamme de concentrations connues et du point de concentration utilisé au cours de la série, le logiciel d'analyse permet d'estimer le nombre de copies de la séquence cible par microlitre d'éluat. Le nombre de copies par millilitre de sérum est obtenu en rapportant le nombre de copies par  $\mu\text{l}$  au volume d'éluat amplifié, au volume de sérum extrait et au volume d'éluat obtenu. La procédure de validation biologique des résultats est disponible en annexe 3. La figure 19 présente un des résultats positifs obtenu au cours de la mise au point de la PCR.

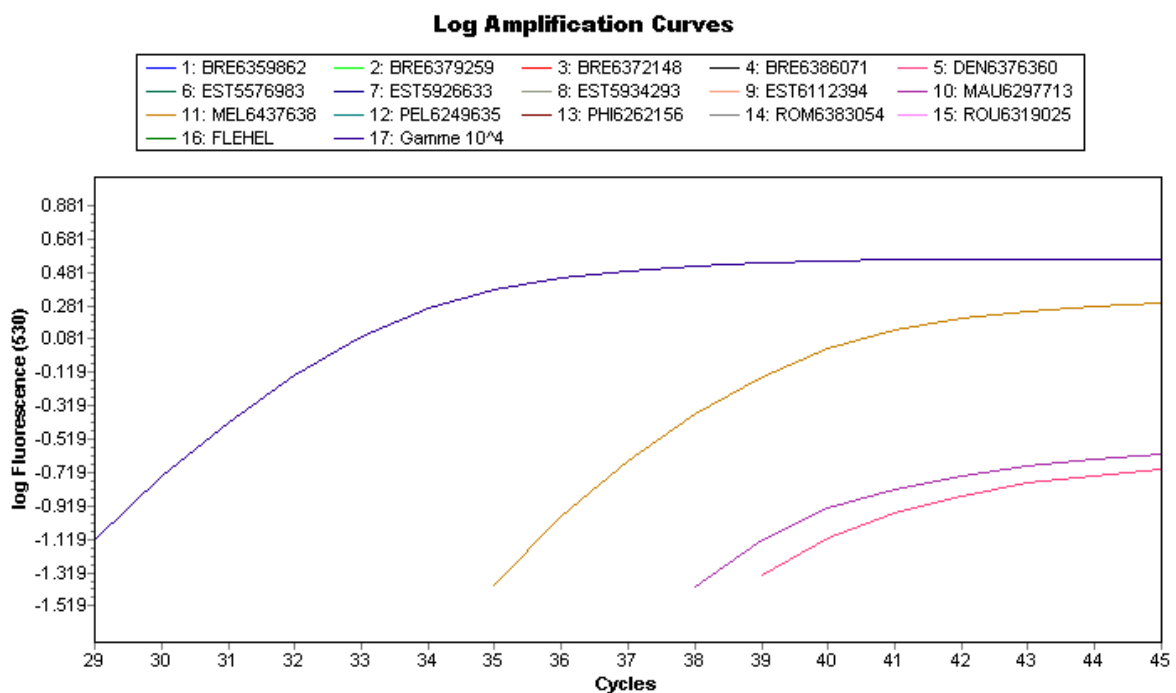


Figure 19 : résultats de PCR positifs au cours de la mise au point

## 6. Interprétation d'un résultat négatif

Dans notre méthode, un résultat est considéré comme négatif si, dans les conditions définies dans le programme d'analyse :

- il n'y a aucune amplification significative dans le canal « 530 nm »
- et en l'absence d'inhibition de la réaction de PCR (le  $C_t$  du contrôle interne est conforme au résultat attendu dans des conditions de réaction sans inhibition de la PCR).

## 7. Etude rétrospective

Une étude rétrospective a été menée sur 106 sérums prélevés chez 31 patients. Les sérums ont été sélectionnés chez des patients tous connus et classés par la « cellule aspergillose » en place au CHU de Grenoble (groupe de travail pluridisciplinaire se réunissant une fois par mois et chargé de la classification des cas d'AI selon les critères EORTC), principalement sur des critères de positivité de l'antigénémie GM. Ils ont été analysés à la fois en antigénémie GM et en PCR *A. fumigatus*. La date du diagnostic était connue et, quand cela était nécessaire, les renseignements cliniques, radiologiques et thérapeutiques étaient collectés à l'aide du logiciel « Cristal-link ».

La population analysée en PCR et GM était constituée de la manière suivante :

- 17 patients atteints d'AI (15 AI probables et 2 AI certaines),
- 14 patients indemnes d'AI mais avec un ou plusieurs résultats positifs en antigénémie GM.

La pertinence du résultat de la PCR était analysée en étudiant la concordance entre l'un des résultats de PCR et le diagnostic retenu par la cellule aspergillose : un seul résultat positif a été considéré comme significatif.

## 8. Etude prospective

Une étude prospective a été menée conjointement avec le service d'hématologie clinique du CHU de Grenoble. Les patients, en majorité allogreffés de cellules souches, étaient suivis à la fois par antigénémie GM et par PCR. L'étude regroupe 60 patients pour 373 sérums. Les

patients avec antigénémie GM positive sont passés à la « cellule aspergillose ». Pour les patients présentant une ou plusieurs PCR positive, la classification a été réalisée en se basant sur les renseignements cliniques, radiologiques et biologiques disponibles dans « Cristal-link ». La population analysée était ainsi composée de :

- 4 patients atteints d'AI (2 AI probables et 2 AI possibles),
- 56 patients indemnes d'AI dont 2 patients avec un ou plusieurs résultats positifs en antigénémie GM.

La pertinence du résultat de la PCR était analysée en étudiant la concordance entre l'un des résultats de PCR et le diagnostic retenu par la cellule aspergillose : un seul résultat positif a été considéré comme significatif.

## **9. Analyse des résultats**

Les résultats ont été analysés en compilant les résultats des deux études dans le but d'avoir l'évaluation la plus précise possible (le plus grand nombre de cas d'AI et le plus grand nombre de patients indemnes d'AI). Les différents calculs ont été réalisés avec le logiciel de bio-informatique « XLStat ».

Voici les définitions des principales variables statistiques utilisées :

- la sensibilité (Se) : probabilité d'avoir un test positif quand on est malade,
- la spécificité (Sp) : probabilité d'avoir un test négatif quand on n'est pas malade,
- la valeur prédictive positive (VPP) : probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif,
- la valeur prédictive négative (VPN) : probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif,
- le rapport de vraisemblance positif (LR+) : estime le rapport de probabilité d'avoir un test positif chez le malade à celui d'avoir un test positif chez le sujet sain,
- le rapport de vraisemblance négatif (LR-) : estime le rapport de probabilité d'avoir un test positif chez le malade à celui d'avoir un test positif chez le sujet sain,
- le risque relatif : estime la chance supplémentaire d'être malade quand le test est positif par rapport au cas où le test est négatif,
- le rapport de cote diagnostique : montre la force d'association entre un test et la maladie.

## **Résultats**

### ➤ Evaluation des performances de la méthode de PCR développée

Les résultats de l'analyse des performances de la PCR sont détaillés dans tableau IV. En raison du faible nombre d'AI possibles et certaines au cours des études prospectives et rétrospective, la puissance statistique de l'analyse est très faible et ainsi les intervalles de confiance à 95% sont larges. Les principales valeurs à extraire de ce tableau sont les sensibilités, spécificités, valeurs prédictives positive et négative dans les sous-groupes AI probables et AI probables + certaines où la puissance de l'analyse statistique est la plus intéressante (échantillons importants).

### ➤ Evaluation des performances de la combinaison des marqueurs (GM et PCR)

Les résultats de l'analyse de performance de la combinaison des marqueurs (GM et PCR) sont détaillés dans le tableau V. En raison du faible nombre d'AI certaines au cours des études prospective et rétrospective, la VPP de la combinaison de marqueurs pour ce groupe diagnostique semble plus basse que pour les AI probables (en raison de l'existence d'un double faux positif chez un patient indemne d'AI, profil rare probablement lié à la translocation conjointe de GM et d'ADN fongique depuis le tube digestif). En pratique, ce sous-groupe devrait présenter une performance supérieure au sous-groupe des AI probables en raison du caractère prouvé de l'AI.

### ➤ Résultats de la PCR chez les patients atteints d'AI

Les résultats pour chaque patient sont présentés, avec les cinétiques des marqueurs, dans le tableau VI.

### ➤ Résultats de la PCR chez les patients indemnes d'AI présentant une ou plusieurs antigénémies GM positives

Les résultats chez ces patients sont présentés dans le tableau VII.

### ➤ Interprétation des résultats de PCR positives chez les patients indemnes d'AI

Les résultats chez ces patients sont présentés dans le tableau VII.

Performances (intervalle de confiance à 95%)	Groupes de patients				
	AI possible	AI probable	AI certaine	AI probable + certaine	AI possible + probable + certaine
<b>Sensibilité</b>	1,00 (0,29-1,00)	0,77 (0,52-0,91)	1,00 (0,29-1,00)	0,79 (0,56-0,92)	0,81 (0,59-0,93)
<b>Spécificité</b>	0,80 (0,69-0,88)	0,80 (0,69-0,88)	0,80 (0,69-0,88)	0,80 (0,69-0,88)	0,80 (0,69-0,88)
<b>VPP</b>	0,13 (0,00-0,29)	0,48 (0,29-0,67)	0,13 (0,00-0,29)	0,52 (0,34-0,70)	0,55 (0,37-0,72)
<b>VPN</b>	1,00 (1,00-1,00)	0,93 (0,87-1,00)	1,00 (1,00-1,00)	0,93 (0,87-1,00)	0,93 (0,87-1,00)
<b>LR+</b>	5,00 (3,13-7,99)	3,82 (2,23-6,55)	5,00 (3,13-7,99)	3,95 (2,34-6,66)	4,05 (2,43-6,76)
<b>LR-</b>	0,00	0,29 (0,12-0,70)	0,00	0,26 (0,11-0,63)	0,24 (0,10-0,58)
<b>Risque relatif</b>	NC	7,22 (2,75-18,99)	NC	7,76 (2,99-20,12)	8,23 (3,21-21,10)
<b>Rapport de cote diagnostique</b>	NC	13,00 (3,86-43,72)	NC	15,00 (4,53-49,69)	17,00 (5,19-55,65)

Tableau IV : résumé des performances de la PCR selon la classification EORTC de l'AI (NC : non calculable)

Performances (intervalle de confiance à 95%)	Groupes de patients		
	AI probable	AI certaine	AI probable + certaine
<b>VPP</b>	0,93 (0,79-1,00)	0,67 (0,13-1,00)	0,94 (0,82-1,00)
<b>VPN</b>	1,00	1,00	1,00

Tableau V : résumé des performances de la combinaison GM/PCR (un profil GM+/PCR+ définit une combinaison positive, un profil GM-/PCR- définit une combinaison négative)



Patient	Terrain	Diagnostic (date)	Résultats biologiques : nombre de prélèvements positifs/nombre de prélèvements testés (date du 1 <sup>er</sup> positif – date du dernier positif)		
			Total	GM	PCR
1	Allogreffe	AI probable (02/05/2013)	1	1/1 (J0)	0/1
2	LAM (consolidation)	AI probable (03/01/2013)	2	1/2 (J0)	2/2 (J0 – J7)
3	Chirurgie viscérale	AI certaine (24/10/2013)	4	1/3 (J0)	1/1 (J13)
4	Aplasie médullaire	AI probable (29/07/2013)	10	4/10 (J0 - J14)	2/10 (J-7 – J3)
5	Allogreffe (GVHD grave)	AI probable (28/10/2011)	14	14/14 (J0 – J74)	11/14 (J11 – J74)
6	LLC (induction)	AI probable (06/05/2011)	3	3/3 (J22 – J31)	3/3 (J22 - J31)
7	LAM (rattrapage)	AI probable (03/11/2011)	2	2/2 (J-6 – J0)	2/2 (J-6 – J0)
8	LAM (induction)	AI probable (07/05/2012)	6	5/6 (J2 – J17)	0/6
9	LAM (induction)	AI probable (10/08/2012)	9	2/9 (J6 – J7)	3/9 (J6 – J10)
10	Chirurgie viscérale	AI certaine (16/09/2013)	1	1/1 (J0)	1/1 (J0)

<b>11</b>	Allogreffe (rechute précoce LAM)	AI probable (29/05/2012)	6	6/6 (J0 – J20)	5/6 (J2 - J20)
<b>12</b>	Lymphome B (rattrapage)	AI probable (28/02/2012)	4	4/4 (J0 – J12)	4/4 (J0 – J12)
<b>13</b>	LA (induction)	AI probable (06/12/2011)	1	1/1 (J0)	0/1
<b>14</b>	LAM (induction)	AI probable (03/06/2013)	6	6/6 (J0 – J17)	5/6 (J0 – J14)
<b>15</b>	Allogreffe (rechute précoce LAM)	AI probable (14/04/2011)	1	1/1 (J0)	1/1 (J0)
<b>16</b>	LAM (induction)	AI probable (10/03/2011)	1	1/1 (J0)	0/1
<b>17</b>	Transplantation cardiaque	AI probable (21/05/2013)	2	2/2 (J0 – J31)	1/1 (J31)
<b>18</b>	Allogreffe	AI probable (12/11/2012)	3	2/3 (J0 – J14)	0/3
<b>19</b>	Allogreffe	AI probable (12/11/2012)	15	2/15 (J0 – J3)	2/15 (J0 – J3)
<b>20</b>	Allogreffe	AI possible (30/10/2012)	16	0/16	3/16 (J3 – J28)
<b>21</b>	Allogreffe	AI possible (04/12/2012)	3	0/3	2/3 (J-8 – J-1)

Tableau VI: résultats de la PCR chez les patients atteints d'AI au cours des études prospective et rétrospective.

Patient	Date de la première antigénémie positive	Résultats biologiques : nombre de prélèvements positifs/nombre de prélèvements testés (date du 1 <sup>er</sup> positif – date du dernier positif)		
		Total	GM	PCR
1	18/11/2011	1	1/1 (J0)	0/1
2	15/12/2011	8	8/8 (J0-J49)	0/8
3	19/09/2011	1	1/1 (J0)	0/1
4	16/08/2011	1	1/1 (J0)	0/1
5	31/10/2011	2	2/2 (J0-J94)	0/2
6	09/02/2010	4	4/4 (J0-J57)	0/4
7	11/07/2013	4	4/4 (J0-J33)	0/4
8	29/08/2011	1	1/1 (J0)	0/1
9	12/09/2011	1	1/1 (J0)	0/1
10	27/05/2011	1	1/1 (J0)	0/1
11	05/05/2011	2	2/2 (J0-J4)	0/2
12	27/07/2011	4	4/4 (J0-J260)	0/4
13	10/11/2011	1	1/1 (J0)	0/1
14	30/10/2012	2	2/2 (J0-J14)	0/2
15	18/07/2013	2	2/2 (J0-J7)	1/2 (J0)

Tableau VII : résultats de la PCR chez les patients indemnes d'AI et présentant une ou plusieurs antigénémies GM positives au cours des études prospective et rétrospective

Patient	Terrain	Nombre de PCR positives (nombre de prélèvements analysés)
1	Allogreffe	1/7
2	Allogreffe	1/9
3	Allogreffe	1/7
4	Allogreffe	1/10
5	Allogreffe	1/8
6	Allogreffe	1/4
7	Allogreffe	1/6
8	Allogreffe	3/12
9	Aplasie médullaire	1/6
10	Allogreffe	2/10
11	Allogreffe	1/4
12	Myélome multiple	1/5

Tableau VIII : résultats positifs de PCR chez les patients indemnes d'AI et négatifs en antigénémie GM au cours des études prospective et rétrospective

## **Discussion**

Le diagnostic biologique d'une AI doit remplir plusieurs objectifs. Il doit être sensible et précoce pour permettre la mise en place d'un traitement spécifique qui garantit une survie plus élevée (163). Il doit présenter une spécificité élevée afin d'éviter les diagnostics inappropriés et proposer une « fiabilité » suffisante pour limiter la stratégie des traitements antifongiques empiriques qui présente de nombreux inconvénients (coût élevé, apparition de résistances, interactions médicamenteuses). Pour finir, il doit être réalisable sur des prélèvements facilement accessibles afin de permettre un monitoring adapté aux situations cliniques (plusieurs fois par semaines chez les patients à risque). Les biomarqueurs sériques disponibles au CHU de Grenoble ne répondent pas à l'ensemble de ces contraintes. En effet, seul le GM est disponible et ce marqueur a de nombreuses limites (manque de spécificité, présence de faux négatifs). C'est pourquoi la méthode de PCR en temps réel sur sérum a été développée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

### **➤ Pertinence des études réalisées**

L'évaluation de la pertinence (avantages et inconvénients) de nos études est présentée en tableau 9.

### **➤ Sensibilité**

La méthode de PCR mise au point possède une sensibilité de 79% dans le diagnostic d'AI prouvées et probables sur des patients issus d'une population globale (une majorité de patients présentant des pathologies hématologiques). Celle-ci est meilleure que celle relevée pour le GM dans la principale méta-analyse (102), à savoir 61%. La PCR semble donc capable d'améliorer le diagnostic des AI au CHU de Grenoble, d'autant que 2 patients classés jusqu'à présent en AI possible présentaient au moins 2 PCR positives contemporaines des signes cliniques et radiologiques (patients 20 et 21). Par ailleurs, la sensibilité de notre méthode est comparable à la sensibilité de la PCR relevée dans la méta-analyse concernant le diagnostic moléculaire des AI sur prélèvements sanguins (153), soit 75%. Cette valeur mérite également d'être comparée aux publications utilisant la même méthode : la sensibilité observée dans d'autres centres varie de 84,6% (145) à 100% (149) pour les AI prouvées ou probables.

Avantages		Inconvénients
<b>Etude rétrospective</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tous les patients ont été classés par la « cellule aspergillose »</li> <li>- Les opérateurs de la PCR étaient familiers de la technique utilisée et des risques de contamination</li> <li>- Nombre important de cas d'AI permettant d'étudier avec pertinence la sensibilité de la méthode</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biais de sélection des sérums par l'antigénémie GM (pas d'AI possible dans cette étude)</li> <li>- Pas de sérums antérieurs à la date du diagnostic permettant d'apprécier un éventuel diagnostic plus précoce à l'aide de la PCR</li> <li>- Peu de suivis de patients permettant d'apprécier des différences de cinétique entre la PCR et le GM au cours du traitement antifongique</li> <li>- Peu de patients indemnes d'AI ne permettant pas d'apprécier la spécificité de la PCR</li> </ul>
<b>Etude prospective</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de biais de sélection par l'antigénémie GM (présence de 2 AI possibles)</li> <li>- Suivi de nombreux patients avec présence de sérums avant la date du diagnostic dans les 2 cas d'AI probables (comparaison de la cinétique des marqueurs)</li> <li>- Présence de nombreux patients indemnes d'AI avec GM négatif (évaluation précise de la spécificité de la PCR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu de cas d'AI</li> <li>- Opérateur principal de l'étude peu familier de la technique (risque plus élevé de contamination)</li> </ul>

Tableau IX : pertinence des études rétrospective et prospective réalisées

### ➤ **Spécificité**

La spécificité de 80% semble inférieure à la spécificité du GM sur une population globale soit 93% mais il est possible de discuter cette apparente infériorité :

- la population « contrôle » de notre étude est très majoritairement composée de patients allogreffés de moelle osseuse, population dans laquelle le GM présente une spécificité moins bonne, à 65% (160),
- certaines des manipulations ayant été réalisées dans l'étude prospective par un opérateur en apprentissage, le risque de faux positif apparaît plus important, du fait de la sensibilité des PCR fongiques aux contaminations de laboratoire (154),
- sur les 15 patients ayant présenté des faux positifs en GM, seul un patient a présenté un résultat positif en PCR (pouvant évoquer un cas de translocation digestive conjointe d'ADN et de GM (156)), ce qui indique une meilleure spécificité de la PCR dans ce contexte.

Par ailleurs, la spécificité semble comparable à celle relevée dans la méta-analyse précédemment citée, soit 87%.

### ➤ **Interprétation des résultats**

- Chez les patients atteints d'AI (tableau VI)

Les résultats obtenus au cours de l'évaluation de la méthode ont permis de mettre en évidence à la fois des concordances et des différences de cinétiques entre le GM et la PCR pouvant apporter :

- la confirmation du diagnostic (n=14) avec soit une PCR positive en même temps que le GM (n=9) soit une PCR positive après le GM (n=5),
- un diagnostic plus tardif PCR positive après la négativation du GM par traitement (n=3),
- un diagnostic plus précoce avec PCR positive avant le GM (n=2),
- une possibilité d'établissement du diagnostic avec une PCR positive seule chez des patients présentant une clinique et une imagerie compatible (n=2),
- une absence de confirmation du diagnostic avec une PCR négative chez des patients (n=5) ; chez ces patients, une différence de cinétique entre les 2 marqueurs ou un cas d'AI à *A. non fumigatus* peuvent être à l'origine de cette discordance.

- Chez les patients indemnes d'AI et GM+ (tableau VII)

Chez ces patients ne présentant pas de signes cliniques et/ou radiologiques évocateurs d'AI, la présence d'une positivité en GM est toujours compliquée à interpréter. La PCR permet d'éliminer le diagnostic d'AI avec une probabilité de 93% (n=14). Cependant, en raison des différences de cinétique entre les deux marqueurs et de la possibilité d'AI à *A. non-fumigatus*, le clinicien devra contrôler les résultats sur un nouveau prélèvement et confronter ceux-ci à la clinique et à la radiologie pour éliminer définitivement le diagnostic d'AI. Un seul patient indemne d'AI avec un GM positif a présenté une PCR positive : il s'agissait très probablement d'une translocation digestive d'ADN fongique (156).

- Chez les patients indemnes d'AI GM-/PCR+ (tableau VIII)

Ces résultats sont compatibles avec des cas de contaminations de laboratoire pour les patients présentant un seul résultat positif (n=10). Les cas observés ici étaient les résultats d'un opérateur en apprentissage ne concordant pas (en termes de fréquence de positivité isolée) avec ceux obtenus précédemment par des opérateurs expérimentés.

Pour les cas où plusieurs résultats sont positifs et en présence d'un patient sous chimioprophylaxie anti-aspergillaire (n=2), la circulation d'ADN est possible sans qu'il n'y ait d'AI ; on parle d'infections infra-cliniques (164). Chez ces patients, le traitement bloque la phase de croissance fongique (diminuant la quantité de GM présente dans le sang) et la lyse fongique libère de l'ADN. La PCR étant le seul marqueur biologique positif avant l'apparition des signes cliniques, elle trouve ici un intérêt majeur dans le diagnostic des AI.

- Chez les patients indemnes d'AI GM-/PCR-

Ces résultats (non présentés) sont rencontrés chez 41 patients de l'étude prospective. Ils sont à l'origine de l'excellente valeur prédictive négative de la combinaison GM/PCR dans le diagnostic d'AI chez des patients à risque.

➤ **Stratégie de prescription de la PCR sur prélèvement sanguin**

La prescription de la PCR *A. fumigatus* est différente selon les centres. La littérature contient de nombreuses stratégies différentes. Le paragraphe suivant présente les différentes utilisations de la PCR relevées au cours de notre recherche bibliographique et la comparaison avec les résultats que nous avons obtenus au cours de notre évaluation.



- La PCR vient confirmer un résultat de GM positif

Certains centres (165) (155) ont testé des stratégies où la PCR vient en complément de l'antigénémie quand cette dernière est positive : cette stratégie peut renforcer la signification d'un test positif en GM (démonstré chez les patients transplantés hépatiques). Cette stratégie a été confirmée (166) récemment comme étant efficace et de faible coût.

Notre étude a évalué cette stratégie où la PCR vient en complément de l'antigénémie quand cette dernière est positive. Les stratégies du double positif (GM/PCR) et du double négatif apportent d'excellents résultats. Les résultats GM+/PCR+ ont une valeur prédictive positive de 93% dans le diagnostic d'AI certaine ou probable c'est-à-dire que dans plus de 9 cas sur 10 où ce résultat est retrouvé, le patient est atteint d'AI. Les résultats GM-/PCR- ont une valeur prédictive négative de 100% c'est-à-dire que ce profil n'a jamais été retrouvé chez un patient atteint d'AI. Cependant, il est envisageable de rencontrer des véritables AI où la PCR et le GM restent négatifs (AI possibles). Dans notre étude, nous n'en avons pas rencontré et un tel résultat associé à une forte suspicion clinique et radiologique doit inciter à répéter l'analyse.

- La PCR et le GM sont réalisés de façon systématique en « screening » bihebdomadaire

Pour certains auteurs (103), cette stratégie apporte une grande précocité au diagnostic. Dans leur étude, 2 types de PCR ont été évalués en complément du GM (une PCR nichée sur la cible ARNr 28S et une PCR en temps réel sur la cible 5,8S). Dans 80% des cas, l'un des tests était positif avant le scanner thoracique. La spécificité diagnostique était maximale en confirmant les résultats sur un deuxième prélèvement. Ces résultats sont confirmés (166) sur une publication plus récente qui a également montré la non-infériorité de cette stratégie diagnostique (combinée à l'imagerie et la clinique) pour guider l'utilisation d'un traitement antifongique (comparée à l'utilisation de traitement empirique). Dans cette étude, basée notamment sur l'utilisation d'une PCR en temps réel sur sérum ciblant une séquence mitochondriale, une PCR positive suffisait pour classer le patient comme positif. Les auteurs insistaient également sur la nécessité de prescrire correctement les biomarqueurs en fonction de la période de risque d'AI et que leur utilisation en dehors de cette période à risque expose à des faux-positifs.

Dans notre étude prospective, seuls 28 des 60 patients ont présenté un suivi bihebdomadaire suffisamment prolongé par GM et PCR. Cependant, nous avons retrouvé la notion de précocité dans notre étude puisque sur 3 des 4 cas d'AI (probable ou possible) de cette étude l'un des marqueurs était positif avant l'imagerie. La confirmation d'un test positif sur un deuxième résultat augmente la spécificité du suivi. Ceci est particulièrement vrai pour les cas où la PCR est retrouvée positive seule car sur 12 patients présentant une PCR positive, seuls 2 ont eu à nouveau une PCR positive sur un nouveau prélèvement dans la suite du suivi.

- La PCR est utilisée en surveillance une fois par semaine (combinée au GM 2 fois par semaine)

Une étude australienne (167) a évalué la pertinence d'un suivi par GM (2 fois par semaine) couplé à une PCR (pan-aspergillaire) une fois par semaine couplée à l'utilisation du scanner thoracique en cas de positivité d'un marqueur : cette stratégie a été comparée aux diagnostics classiques (combinaison histologie et culture). Leur stratégie est présentée en figure 20.

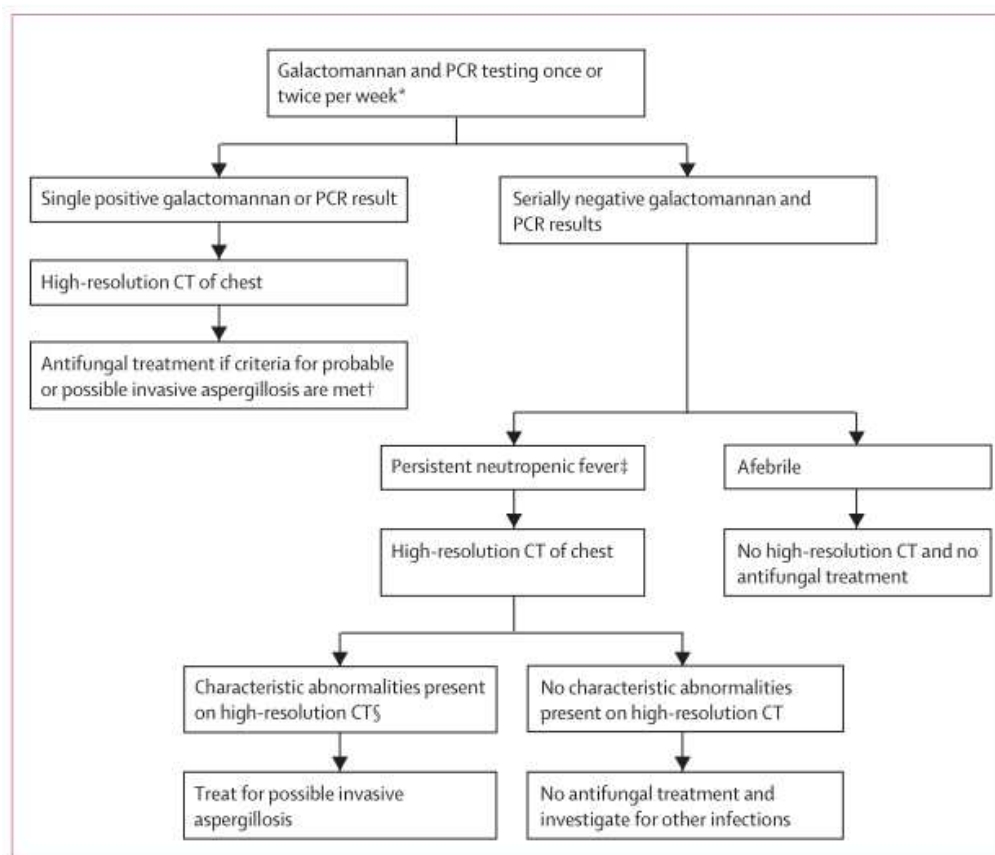


Figure 20 : exemple de stratégie de diagnostic des AI chez des patients d'hématologie (d'après (167))

Cette stratégie, appliquée sur une population à risque d'hématologie (allogreffes de cellules souches et LAM/LAL en induction), a démontré :

- sa supériorité en termes de précocité de diagnostic (diagnostic 4 à 7 jours plus tôt), ce qui reste la clé de la prise en charge d'une AI,
- sa non-infériorité en termes de survie des patients dans le cas où elle permettrait de remplacer un traitement empirique (sans résultat biologique confirmé) par un traitement guidé par les résultats des biomarqueurs sans perte de chance pour les malades.

Notre étude a mis en avant la précocité du diagnostic par rapport à l'imagerie. Cependant pour 2 des 4 cas diagnostiqués avant l'imagerie, la PCR était le seul test positif. Ainsi réduire la fréquence de la PCR expose à perdre en précocité diagnostique.

## **Conclusion**

Cette étude a permis de développer la recherche d'ADN d'*A. fumigatus* au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble. Cette analyse comprend l'extraction automatisée de l'ADN sur MagNA Pure (Roche Diagnostics) et la PCR quantitative pour le diagnostic d'aspergillose invasive (AI).

L'évaluation des performances de cette méthode appliquée au sérum a été réalisée à l'aide de deux études :

- une étude rétrospective réalisée sur sérothèque de prélèvements connus positifs en antigène galactomannane (GM) incluant 31 patients dont 17 pathologies aspergillaires invasives (15 AI probables, 2 AI certaines),
- une étude prospective conduite en partenariat avec le service d'hématologie clinique incluant 60 patients suivis régulièrement par antigénémie aspergillaire (2 AI probables et 2 AI possibles).

Ces études ont permis de déterminer des performances intéressantes de la PCR comparativement à l'antigénémie GM. La PCR développée présente une sensibilité supérieure au GM dans le diagnostic des AI certaines et probables (79% pour la PCR alors que la sensibilité du GM retrouvée dans la littérature sur une population équivalente n'est que de 61%). La spécificité de la PCR est de 80% et n'est pas supérieure à celle du GM (93 %). Nos résultats ont également montré l'intérêt de la combinaison des deux marqueurs (GM et PCR) : ces deux tests rendus positifs ont une valeur prédictive positive (VPP) de 94% dans le diagnostic des AI, alors que les VPP des deux tests prises isolément sont de 50%. Les deux tests rendus négatifs ont également une excellente VPN de 100%. Les discordances entre les deux tests peuvent être expliquées par la cinétique différente des deux marqueurs. Le GM est sécrété pendant la croissance des filaments à la phase d'invasion alors que l'ADN est détectable après la lyse du champignon. Ainsi, les traitements antifongiques peuvent négativer rapidement l'antigénémie GM alors que l'ADN est encore détectable, permettant de confirmer le diagnostic (cette situation a été rencontrée chez 2 patients de notre étude). Par ailleurs, les cas où l'antigène est positif et la PCR négative sont majoritairement rencontrés chez des patients ne souffrant pas d'AI (cette situation a été rencontrée chez 15 patients de notre étude). Ils ne doivent pas faire oublier la possibilité d'une AI à *Aspergillus non-fumigatus*,

surtout si la présentation clinique et radiologique du patient est compatible avec une AI (situation rencontrée chez 5 patients de notre étude).

La mise au point de cette recherche d'ADN d'*A. fumigatus* sur sérum permet d'améliorer le diagnostic des AI en ciblant un nouveau marqueur de l'infection. La combinaison avec les marqueurs existant permet de renforcer la valeur de ces marqueurs pris isolément. Les perspectives de ce travail sont la mise en place de la PCR *A. fumigatus* sur les prélèvements respiratoires (liquides de lavage broncho-alvéolaire et aspirations bronchiques) et le LCR. L'application à ces milieux passera par la mise au point de techniques d'extraction adaptées aux spécificités de l'*Aspergillus* sp. et par l'évaluation de ces nouvelles analyses.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 27/11/2013

LE DOYEN

LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Christophe RIBUOT



Professeur Muriel CORNET

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop and a horizontal stroke.

## **Bibliographie**

1. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. Clin Microbiol Rev. 2009 Octobre: p. 535-551.
2. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Clin Infect Dis. 2003 Octobre: p. S265-S280.
3. Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. Eur Respir J. 2011 Avril: p. 865-872.
4. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cell Microbiol. 2010 Novembre: p. 1535-1543.
5. Chabasse D, et al. Les moisissures d'intérêt médical: BIOFORMA; 2002.
6. Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Millon L. Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. Rev Mal Resp. 2011 Février: p. 169-179.
7. Chabasse D, et al. Moisissures, dermatophytes, levures : du prélèvement au diagnostic: Biomérieux Education; 2008.
8. Baker SE, Bennett JW. The aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods; 2007.
9. etymologia : *Aspergillus*. Emerging Infectious Diseases. 2006.
10. *Aspergillus.org.uk*. [Online]. [cited 2013 Octobre 5. Available from: [http://www.aspergillus.org.uk/secure/historical\\_papers/allindatabase.php](http://www.aspergillus.org.uk/secure/historical_papers/allindatabase.php).
11. Antimicrobe.org. [Online]. [cited 2013 Octobre 5. Available from: <http://www.antimicrobe.org/history/Aspergillus-Human%20Pathogens.asp>.
12. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis; 2008.
13. Schmidt A, Schmidt DI. J.B. Georg W. Fresenius and the description of the species

*Aspergillus fumigatus* in 1863. Contrib Microbiol. 1999: p. 1-4.

14. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph Neosartorya. Stud Mycol. 2007: p. 147-203.
15. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan SP, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. J Infect. 2012 Novembre: p. 453-464.
16. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. Infect Dis Clin North Am. 2002 Décembre: p. 875-894.
17. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Gomez-Lopez A, et al. Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection. Int J Antimicrob Agents. 2008 Novembre: p. S143-147.
18. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. Clin Infect Dis. 2009 Février: p. 265-273.
19. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang CH, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2010 Juin: p. 220-229.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Crit Rev Microbiol. 2010: p. 1-53.
21. Burgos A, Zaoutis TE, Dvorak CC, Hoffman JA, Knapp KM, et al. Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. Pediatrics. 2008 Mai: p. 1286-1294.
22. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Rev Iberoam Micol. 2010: p. 155-182.

23. Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 2007 Octobre: p. 279-290.
24. Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol.* 2010 Juillet: p. 863-872.
25. Aimanianda V, Latgé JP. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Avril: p. 359-364.
26. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Juillet: p. 447-465.
27. Alp S, Arikan S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol.* 2008 Octobre: p. 331-337.
28. Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T, et al. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2002 Mai: p. 1811-1813.
29. Moore MM. The crucial role of iron uptake in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Décembre: p. 692-699.
30. May GS, Xue T, Kontoyiannis DP, Gustin MC. Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* 2005 Mai: p. S83-S86.
31. Willger SD, Puttikamonkul S, Kim KH, Burritt JB, Grahl N, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2008 Novembre.
32. Paris S, Debeaupuis JP, Cramer R, Carey M, Charlès F, et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Mars: p. 1581-1588.
33. Paris S, Wyssong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2003 Juin: p. 3551-3562.
34. Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge JP. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 2010 Février: p.



910-923.

35. Burns C, Geraghty R, Neville C, Murphy A, Kavanagh K, et al. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 2005 Avril: p. 319-327.
36. Tsitsigiannis DI, Bok JW, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, et al. *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. Infect Immun. 2005 Août: p. 4548-4559.
37. Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. Blood. 2009: p. 5393–5399.
38. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. Infect Immun. 2005 Janvier: p. 635-637.
39. Toyotome T, Yamaguchi M, Iwasaki A, Watanabe A, Taguchi H, et al. Fetuin A, a serum component, promotes growth and biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol. 2012 Mars: p. 108-116.
40. Mowat E, Butcher J, Lang S, Williams C, Ramage G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol. 2007 Septembre: p. 1205-1212.
41. Kaur S, Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2013 Août.
42. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FM. *Aspergillus fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Novembre: p. 4130–4136.
43. Segal BH. Aspergillosis. The New England Journal of Medicine. 2009 Avril: p. 1870-1884.
44. Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*.

Microbes Infect. 2009 Octobre: p. 919-927.

45. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimaganianda V, Nietzsche S, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. PLoS Pathog. 2010 Avril.
46. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. J Parasitol Res. 2012.
47. Bouzani M, Ok M, McCormick A, Ebel F, Kurzai O, et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN- $\gamma$  release. J Immunol. 2011 Août: p. 1369-1376.
48. Schmidt S, Tramsen L, Hanisch M, Latgé JP, Huenecke S, et al. Human Natural Killer Cells Exhibit Direct Activity Against *Aspergillus fumigatus* Hyphae, But Not Against Resting Conidia. The Journal of Infectious Diseases. 2011 Février: p. 430-435.
49. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. N Engl J Med. 2008 Octobre: p. 281-290.
50. Sherif R, B.H. S. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. Curr Opin Pulm Med. 2010 Mai: p. 242-250.
51. Miceli MH, Maertens J, Buvé K, Graziutti M, Woods G, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome in cancer patients with pulmonary aspergillosis recovering from neutropenia: Proof of principle, description, and clinical and research implications. Cancer. 2007 Juillet: p. 112-120.
52. Lortholary O, J.P. G, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clinical Microbiology and Infection. 2011 Décembre: p. 1882-1889.
53. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brückner G, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. J Hosp

- Infect. 2002 Août: p. 288-296.
54. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Wakayama M, Shinozaki M, et al. Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University. *Mycoses*. 2012 Septembre: p. 435-443.
  55. Nicolle MC, Bénet T, Thiebaut A, Bienvenu AL, Voirin N, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica*. 2011 Novembre: p. 1685-1691.
  56. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006 Août: p. 1068-1075.
  57. Neofytos D, Lu K, Hatfield-Seung A, Blackford A, et al. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Février: p. 144-149.
  58. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*. 2010 Avril: p. 1091-1100.
  59. Camps IR. Risk factors for invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Novembre: p. S119-S123.
  60. Singh N, Suarez JF, Avery R, Lass-Flörl C, Geltner C, et al. Immune reconstitution syndrome-like entity in lung transplant recipients with invasive aspergillosis. *Transpl Immunol*. 2013 Décembre: p. 109-113.
  61. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002 Décembre: p. 4358-4366.

62. Clark RA, Johnson FL, Klebanoff SJ, Thomas ED. Defective neutrophil chemotaxis in bone marrow transplant patients. *J Clin Invest.* 1976 Juillet: p. 22-31.
63. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Rev Mal Respir.* 2008 Février: p. 139-153.
64. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, et al. Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2010 Juin: p. 1559-1567.
65. Bodro M, Sabé N, Gomila A, Ayats J, Baliellas C, et al. Risk factors, clinical characteristics, and outcomes of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012 Novembre: p. 2682-2685.
66. Garnacho-Montero J, Olaechea P, Alvarez-Lerma F, Alvarez-Rocha L, Blanquer J, et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of fungal respiratory infections in the critically ill patient. *Rev Esp Quimioter.* 2013 Juin: p. 173-188.
67. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Janvier: p. 44-69.
68. Ader F, Nseir S, Guery B, Tillie-Leblond I. Aspergillose pulmonaire aiguë invasive et pathologies pulmonaires chroniques. *Revue des Maladies Respiratoires.* 2006 Juin: p. S11-S20.
69. Tragiannidis A, Roilides E, Walsh TJ, Groll AH. Invasive aspergillosis in children with acquired immunodeficiencies. *Clin Infect Dis.* 2012 Janvier: p. 258-267.
70. Brissaud O, Guichoux J, Harambat J, Tandonnet O, Zaoutis T. Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care.* 2012 Février.
71. Segal BH, Romani LR. Invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. *Med Mycol.* 2009: p. S282-S290.
72. Guervilly C, Roch A, Ranque S, Forel JM, Hraiech S, et al. A strategy based on galactomannan antigen detection and PCR for invasive pulmonary aspergillosis

- following influenza A (H1N1) pneumonia. J Infect. 2012 Novembre: p. 470-473.
73. de Boer MG, Jolink H, Halkes CJ, van der Heiden PL, Kremer D, et al. Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation. PLoS One. 2011 Avril.
  74. Cunha C, Rodrigues F, Zelante T, Aversa F, Romani L, et al. Genetic susceptibility to aspergillosis in allogeneic stem-cell transplantation. Med Mycol. 2011 Avril: p. S137-143.
  75. Grube M, Loeffler J, Mezger M, Krüger B, Echtenacher B, et al. TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. Med Mycol. 2013 Novembre: p. 818-825.
  76. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. Blood. 2012 Février: p. 1831-1837.
  77. Denning DW. Invasive Aspergillosis. Clin Infect Dis. 1998 Avril: p. 781-805.
  78. Reinwald M, Buchheidt D, Hummel M, Duerken M, Bertz H, et al. Diagnostic performance of an *Aspergillus*-specific nested PCR assay in cerebrospinal fluid samples of immunocompromised patients for detection of central nervous system aspergillosis. PLoS One. 2013.
  79. Cornet M, Ugo V, Lefort E, Molina T, James JM, et al. A Case of Disseminated Aspergillosis with Thyroid Involvement. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001 Mai: p. 358-367.
  80. Perkhofer S, Lass-Flörl C, Hell M, Russ G, Krause R, et al. The Nationwide Austrian *Aspergillus* Registry: a prospective data collection on epidemiology, therapy and outcome of invasive mould infections in immunocompromised and/or immunosuppressed patients. Int J Antimicrob Agents. 2010 Décembre: p. 531-536.
  81. Racil Z, Weinbergerova B, Kocmanova I, Muzik J, Kouba M, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak

- republics: Fungal Infection Database (FIND) analysis, 2005-2009. *Int J Infect Dis*. 2013 Février: p. 101-109.
82. Lin S, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001 Février: p. 358-366.
  83. Nouér SA, Nucci M, Kumar NS, Graziutti M, Restrepo A, et al. Baseline platelet count and creatinine clearance rate predict the outcome of neutropenia-related invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2012 Juin: p. 173-183.
  84. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, et al. Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6-Year Survey. *Clin Infect Dis*. 2006 Septembre: p. 577-584.
  85. Chai L, Netea MG, Teerenstra S, Earnest A, Vonk AG, et al. Early proinflammatory cytokines and C-reactive protein trends as predictors of outcome in invasive Aspergillosis. *J Infect Dis*. 2010 Novembre: p. 1454-1462.
  86. Walsh T, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008 Février: p. 327-360.
  87. Herbrecht R, Flückiger U, Gachot B, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C. Antifungal Therapy in Leukemia Patients UPDATE ECIL 4. [Online].; 2011 [cited 2013 Août 21. Available from: <http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/ECIL/Documents/ECIL%204Update%202011%20Antifungal%20therapy.pdf>.
  88. Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, et al. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect*. 2013 Avril: p. 139-145.
  89. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clinical Infectious Diseases*. 2002 Janvier: p. 7-14.

90. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG). Clin Infect Dis. 2008 Juin: p. 1813-1821.
91. Abramson S. The Air Crescent Sign. Radiology. 2001: p. 230-232.
92. Lee YR, Choi YW, Lee KJ, Jeon SC, Park CK, et al. CT halo sign: the spectrum of pulmonary diseases. Br J Radiol. 2005 Septembre: p. 862-865.
93. Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? Curr Med Res Opin. 2013 Avril: p. S3-S11.
94. Horvath J, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am J Med. 1996 Février: p. 171-178.
95. Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med. 1992 Mai: p. 243-248.
96. Kradin RL, Mark E. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. Arch Pathol Lab Med. 2008 Avril: p. 606-614.
97. Chandrasekar P. Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections. Eur J Haematol. 2010 Avril: p. 281-290.
98. Kauffmann-Lacroix C, Arvier M, Charron M, Rodier MH, Vassault A. Detection of *Aspergillus* antigen galactomannan using ELISA method: Validation of the performances of the method for accreditation. Journal de Mycologie Médicale. 2013 Mars: p. 33-39.
99. Morton CO, Loeffler J, De Luca A, Frost S, Kenny C, et al. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. J Med Microbiol. 2010 Avril: p. 408-413.

100. Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. J Infect Dis. 2007 Février: p. 455-466.
101. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, et al. Detection of Circulating *Aspergillus fumigatus* Galactomannan: Value and Limits of the Platelia Test for Diagnosing Invasive Aspergillosis. J Clin Microbiol. 2003 Mai: p. 2184-2186.
102. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2006 Mai: p. 1417-1427.
103. Rogers TR, Morton CO, Springer J, Conneally E, Heinz W, et al. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. Br J Haematol. 2013 Mai: p. 517-524.
104. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Avril: p. 245-251.
105. Roilides E, Pana ZD. Application of diagnostic markers to invasive aspergillosis in children. Ann N Y Acad Sci. 2012 Décembre: p. 1-8.
106. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. J Clin Microbiol. 2005 Août: p. 3925-3931.
107. Siemann M, Koch-Dörfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Mycoses. 1998 Novembre: p. 373-377.
108. Bergeron A, Porcher R, Menotti J, Poirot JL, Chagnon K, et al. Prospective evaluation of clinical and biological markers to predict the outcome of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients. J Clin Microbiol. 2012 Mars: p. 823-830.



109. Park SH, Choi SM, Lee DG, Choi JH, Kim SH, et al. Serum galactomannan strongly correlates with outcome of invasive aspergillosis in acute leukaemia patients. *Mycoses*. 2011 Novembre: p. 523-530.
110. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*. 2004 Août: p. 641-649.
111. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005 Juin: p. 1762-1769.
112. Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Schaefe RL, et al. Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Janvier: p. 12-23.
113. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, et al. False-positive galactomannan platelia *Aspergillus* test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis*. 2004 Mars: p. 289-290.
114. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C, Touratier S, et al. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect*. 2012 Janvier: p. 10-14.
115. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Ratto S, et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Juillet: p. 1746-1748.
116. Fortún J, Martín-Dávila P, Alvarez ME, Norman F, Sánchez-Sousa A, et al. False-positive results of *Aspergillus* galactomannan antigenemia in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2009 Janvier: p. 256-260.
117. Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R. False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 Juillet: p. 1132-1133.

118. Vergidis P, Walker RC, Kaul DR, Kauffman CA, Freifeld AG, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan assay in solid organ transplant recipients with histoplasmosis. *Transpl Infect Dis*. 2012 Avril: p. 213-217.
119. Huang YT, Hung CC, Liao CH, Sun HY, Chang SC, et al. Detection of circulating galactomannan in serum samples for diagnosis of *Penicillium marneffei* infection and cryptococcosis among patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 2007 Septembre: p. 2858-2862.
120. Giacchino M, Chiapello N, Bezzio S, Fagioli F, Saracco P, et al. *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum*. *J Clin Microbiol*. 2006 Septembre: p. 3432-3434.
121. Petraitiene R, Petraitis V, Witt JR, Durkin MM, Bacher JD, et al. Galactomannan antigenemia after infusion of gluconate-containing Plasma-Lyte. *J Clin Microbiol*. 2011 Décembre: p. 4330-4332.
122. Martín-Rabadán P, Gijón P, Alonso Fernández R, Ballesteros M, Anguita J, et al. False-positive *Aspergillus* antigenemia due to blood product conditioning fluids. *Clin Infect Dis*. 2012 Août: p. 22-27.
123. Guigue N, Menotti J, Ribaud P. False positive galactomannan test after ice-pop ingestion. *N Engl J Med*. 2013 Juillet: p. 97-98.
124. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997 Décembre: p. 353-357.
125. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, et al. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol*. 2009 Janvier: p. 129-133.
126. Pedroza K, de Matos SB, de Moura DL, Oliveira MB, Araújo MA, et al. Reproducibility of Positive Results for the Detection of Serum Galactomannan by Platelia™ *Aspergillus* EIA. *Mycopathologia*. 2013 Octobre: p. 295-297.

127. Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. PLoS One. 2012.
128. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, De Maria A, Paola D, et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. J Clin Microbiol. 2002 Avril: p. 1496-1499.
129. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullberg BJ, Meis JF. *Aspergillus* meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. J Clin Microbiol. 1999 Avril: p. 1186-1189.
130. Marty FM, Koo S. Role of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Med Mycol. 2009: p. S233-S240.
131. Hope WW, Petraitis V, Petraitiene R, Aghamolla T, Bacher J, et al. The initial 96 hours of invasive pulmonary aspergillosis: histopathology, comparative kinetics of galactomannan and (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -d-glucan and consequences of delayed antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Novembre: p. 4879-4886.
132. Koo S, Baden LR, Marty FM. Post-diagnostic kinetics of the (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2012 Mai: p. 122-127.
133. Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, et al. Diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012 Janvier: p. 7-15.
134. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. Clin Vaccine Immunol. 2008 Juillet: p. 1095-1105.
135. Held J, Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel *Aspergillus* lateral-flow device and the Platelia(®) galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. Infection.

2013 Décembre: p. 1163-1169.

136. Wiederhold NP, Thornton CR, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Bocanegra R, et al. Comparison of lateral flow technology and galactomannan and (1->3)-beta-D-glucan assays for detection of invasive pulmonary aspergillosis. Clin Vaccine Immunol. 2009 Décembre: p. 1844-1846.
137. Hoenigl M, Koidl C, Duettmann W, Seeber K, Wagner J, et al. Bronchoalveolar lavage lateral-flow device test for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in haematological malignancy and solid organ transplant patients. J Infect. 2012 Décembre: p. 588-591.
138. Thornton CR, Johnson G, Agrawal S. Detection of invasive pulmonary aspergillosis in haematological malignancy patients by using lateral-flow technology. J Vis Exp. 2012 Mars.
139. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2005 Décembre: p. 1151-1156.
140. Challier S, Abachin E. Intérêt de la PCR dans le diagnostic de l'aspergillose invasive chez les patients immunodéprimés. La Lettre de l'infectiologue. 2005 Mai-Juin: p. 82-87.
141. Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, Patterson TF, Wickes BL. Strain-Dependent Variation in 18S Ribosomal DNA Copy Numbers in *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol. 2009 Mai: p. 1325-1332.
142. Abad A, Fernandez-Molina JV, Ramirez-Garcia A, Sendino J, Hernando FL, et al. The aspHS gene as a new target for detecting *Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR. Med Mycol. 2013: p. 545-554.
143. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol. 1997 Juin: p. 1353-1360.

144. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, et al. Specific Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR. J Clin Microbiol. 1999 Décembre: p. 3865-3871.
145. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2004 Février: p. 844-846.
146. Johnson GL, Bibby DF, Wong S, Agrawal SG, Bustin SA. A MIQE-compliant real-time PCR assay for *Aspergillus* detection. PLoS One. 2012.
147. Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. J Clin Microbiol. 2000 Octobre: p. 3830-3833.
148. Bernal-Martínez L, Gago S, Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Rodríguez-Tudela JL, et al. Analysis of performance of a PCR-based assay to detect DNA of *Aspergillus fumigatus* in whole blood and serum: a comparative study with clinical samples. J Clin Microbiol. 2011 Octobre: p. 3596-3599.
149. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. J Clin Microbiol. 2008 Novembre: p. 3772-3777.
150. Costa C, Vidaud D, Olivi M, Bart-Delabesse E, Vidaud M, et al. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. J Microbiol Methods. 2001 Avril: p. 263-269.
151. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2006 Mai: p. 1711-1718.
152. Sugawara Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, et al. Clinical utility of a

- panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with haematologic disorders. *Eur J Haematol*. 2013 Avril: p. 331-339.
153. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009 Février: p. 89-96.
  154. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *J Clin Microbiol*. 1999 Avril: p. 1200-1202.
  155. Millon L, Piarroux R, Deconinck E, Bulabois CE, Grenouillet F, et al. Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2005 Octobre: p. 5097-5101.
  156. Millon L, Grenouillet F, Crouzet J, Larosa F, Loewert S, et al. False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Med Mycol*. 2010 Juin: p. 661-664.
  157. Guinea J, Padilla C, Escribano P, Muñoz P, Padilla B, et al. Evaluation of MycAssay™ *Aspergillus* for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients without hematological cancer. *PLoS One*. 2013 Avril.
  158. Avni T, Levy I, Sprecher H, Yahav D, Leibovici L, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone compared to galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a systematic review. *J Clin Microbiol*. 2012 Novembre: p. 3652-3658.
  159. Buess M, Cathomas G, Halter J, Junker L, Grendelmeier P, et al. *Aspergillus*-PCR in bronchoalveolar lavage for detection of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis*. 2012 Octobre.
  160. White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol*. 2010 Avril: p. 1231-1240.
  161. Kami M, Ogawa S, Kanda Y, Tanaka Y, Machida U, et al. Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test,

- and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br J Haematol*. 1999 Août: p. 536-537.
162. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008 Avril: p. 619-626.
  163. Millon L, Grenouillet F, Legrand F, Loewert S, Bellanger AP, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA target for real-time PCR diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2011 Mars: p. 1058-1063.
  164. Wingard JR. Have novel serum markers supplanted tissue diagnosis for invasive fungal infections in acute leukemia and transplantation? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2012 Décembre: p. 487-491.
  165. Meije Y, Aguado JM, Cuenca-Estrella M. Silent and prolonged *Aspergillus* DNAemia in oncohematological patients receiving antifungal prophylaxis: a new phenomenon with clinical implications. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Juillet: p. 1016-1017.
  166. Botterel F, Farrugia C, Ichai P, Costa JM, Saliba F, et al. Real-time PCR on the first galactomannan-positive serum sample for diagnosing invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2008 Octobre: p. 333-338.
  167. Schwarzhinger M, Sagaon-Teyssier L, Cabaret O, Bretagne S, Cordonnier C, et al. Performance of serum biomarkers for the early detection of invasive aspergillosis in febrile, neutropenic patients: a multi-state model. *PLoS One*. 2013 Juin.
  168. Morrissey CO, Chen SC, Sorrell TC, Milliken S, Bardy PG, et al. Galactomannan and PCR versus culture and histology for directing use of antifungal treatment for invasive aspergillosis in high-risk haematology patients: a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2013 Juin: p. 519-528.

# **Annexes**

## **Annexe 1** : Critères EORTC/MSG adaptés à l'AI selon De Pauw (90)

### **Critères définissant les facteurs d'hôte :**

- ❖ Neutropénie < 0,5 G/L pendant plus de 10 jours
- ❖ Receveur d'une allogreffe de moelle
- ❖ Utilisation prolongée de corticoïdes à une dose supérieure à 0,3 mg/kg/jr (en équivalent prednisone) pendant plus de 3 semaines
- ❖ Traitement dans les 90 derniers jours par des immunosuppresseurs atteignant les lymphocytes T tels que la ciclosporine, des anti-TNF $\alpha$ , des anticorps monoclonaux ou des analogues nucléosidiques
- ❖ Déficit immunitaire congénital (tel que la granulomatose septique chronique et le DICS)

### **Critères radio-cliniques :**

- Aspergillose pulmonaire invasive
  - ❖ Présence d'un des trois signes suivants au scanner thoracique : nodule avec ou sans signe du halo, signe du croissant ou cavité
- Aspergillose trachéobronchique
  - ❖ Ulcération trachéobronchique, nodules, pseudomembranes, présence de plaque ou d'escarre à la bronchoscopie
- Aspergillose sinusienne invasive
  - ❖ Imagerie montrant une sinusite en présence de l'un des trois signes suivants : douleur aiguë localisée, ulcère nasal avec une escarre, extension osseuse
- Aspergillose cérébrospinale
  - ❖ Un des deux signes suivants : atteinte focale à l'imagerie ou rehaussement méningé à l'IRM ou au scanner cérébral



## **Critères biologiques :**

- Diagnostic direct
  - ❖ Présence d'*Aspergillus* spp. dans une expectoration, un lavage broncho-alvéolaire, une aspiration bronchique ou une aspiration sinusienne mise en évidence par un examen direct positif et/ou une culture positive
- Diagnostic indirect
  - ❖ Détection de galactomannanes dans le plasma, le sérum, le liquide céphalorachidien ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire
  - ❖ Détection de (1→3)-β-D-glucane dans le sérum

## **Annexe 2 : Classification des aspergilloses invasives selon De Pauw (90)**

### **Aspergillose invasive prouvée :**

- Observation sur une biopsie de mycélium évoquant l'*Aspergillus* sp. (filaments septés et ramifiés à 45°) avec une preuve d'une atteinte tissulaire (angioinvasion par exemple)
- Culture d'*Aspergillus* spp. depuis un prélèvement d'un site normalement stérile et atteint cliniquement ou radiologiquement (à l'exception d'une urine, d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire et d'un prélèvement d'un sinus)


### **Aspergillose invasive probable :**

- Présence d'un critère d'hôte, d'un critère clinique et d'un critère biologique

### **Aspergillose invasive possible :**

- Présence d'un critère d'hôte et d'un critère clinique, en l'absence de critère biologique

**Annexe 2 :** procédures techniques permettant la réalisation de la PCR *A. fumigatus*

	<b>Pôle de Biologie et de Pathologie</b>  <b>Parasitologie - Mycologie</b>	PAM-PCR-MOP-XXX
	<b>PCR <i>Aspergillus</i> : extraction d'ADN automatique avec le Roche MagNA Pure</b>	
Date de diffusion : / /		Rédigée par : D ROSSIGNOL
Version : 1		Vérifiée par :
Pages :		Approuvée par :

**Objet**

Extraction de l'ADN en vue de l'amplification de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* à partir de sérum.

**Domaine d'application**

- Sérum (1 mL)

**Personnel**

- Technicien(ne)s

**Matériels et réactifs**

- Automate Roche MagNA Pure
- Consommables Roche (plaques, cuves, couvercles...)
- Kit d'extraction Roche « Total NA Large Volume »
- PSM
- Pipette de 1 mL avec ses cônes
- Pipette de 20 µL avec ses cônes
- Contrôle interne « Argene »
- Parafilm

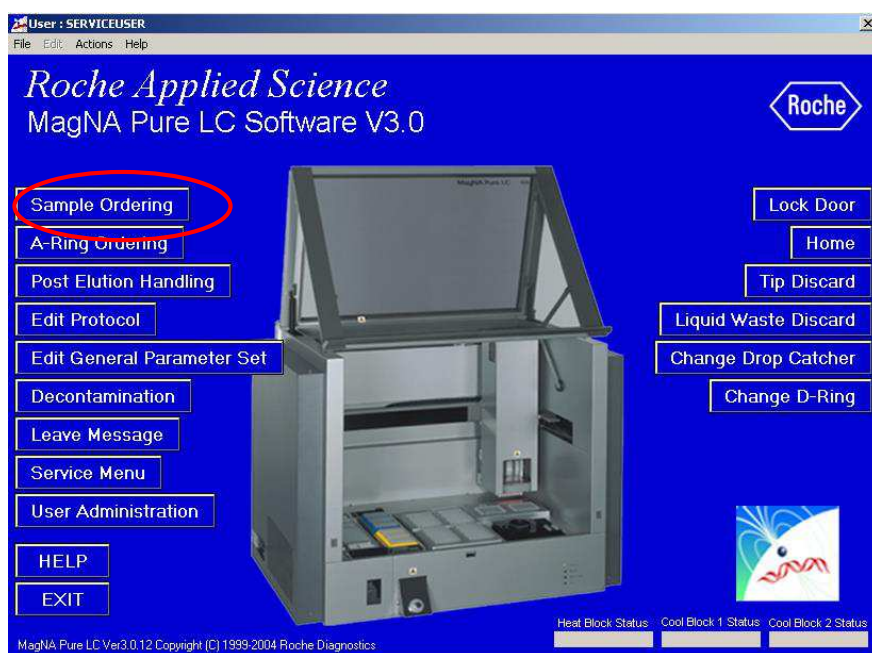
## Contenu

### Paramétrage informatique :

Aller dans la pièce N3-233, si le MagNA Pure est éteint, l'allumer.

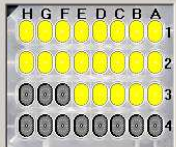
Ouvrir le logiciel « MagNAPure 3.0 » :

- Cliquer sur « SAMPLE ORDERING »



- Saisir la liste des sérums à extraire en supprimant les cases inutiles (qui doivent être « grisées » si inutilisées)
- Choisir le programme « Total NA Large Volume 3\_5 » en utilisant le menu déroulant

#	Sample Name	Comment	Pos
01			A1
02			B1
03			C1
04			D1
05			E1
06			F1
07			G1
08			H1
09			A2
10			B2
11			C2
12			D2
13			E2
14			F2
15			G2
16			H2
17			A3
18			B3
19			C3
20			D3
21			E3
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			



Protocol  
 [V4\_0\_DNA I Rlnrd Cell]

Post Elution Protocol  
 [None]

MagNz  
 DNA I  
 DNA II  
 DNA III  
 DNA LV  
 mRNA H5  
 mRNA I  
 mRNA II  
 RNA HP  
 RNA III

LC Param. Kit Lot or Primer/Probe  
 Control Template

LC Ma  
 mRNA H5  
 mRNA I  
 mRNA II  
 RNA HP  
 RNA III

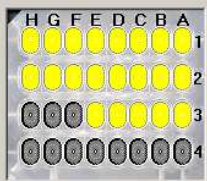
LC Car

Test  
 Total NA  
 Total NA HP  
 Total NA LV  
 Total NA LV  
 (None)

[200 µl]  
 [100 µl]  
 [V3\_5\_Total NA LV Serum\_Plasma.blk]  
 [V4\_0\_Total NA LV Serum\_Plasma.blk]  
 [Waste Discard]

Stage Setup

- Vérifier le volume d'élution à 50 µL



Protocol  
 [V3\_5\_Total NA LV Seru]

Post Elution Protocol  
 [None]

MagNA Pure LC Kit Lot  
 LC Master Kit Lot  
 LC Carousel Number

LC Param. Kit Lot or Primer/Probe  
 Control Template

Sample Volume  
 [1000 µl]

Elution Volume  
 [50 µl]

Dilution Volume  
 [0 µl]

☐ Liquid Waste Discard

Stage Setup

- Cliquer sur « Stage Setup »
- Vous arrivez à l'écran indiquant les réactifs et consommables nécessaires à la réalisation de l'extraction.

- Relever les volumes et les couleurs des bouchons des réactifs nécessaires à l'extraction dans l'ordre affiché : voici un tableau qui résume les différents volumes à préparer en fonction du nombre de patients à extraire

Nombre de sérums extraits		1 à 8	9 à 16	17 à 24	25 à 32
<b>Cuve grand format</b>	Wash Buffer I (noir)	10,8 mL	17,6 mL	24,4 mL	31,2 mL
	Wash Buffer III (rouge)	11,0 mL	18,2 mL	25,4 mL	32,6 mL
<b>Cuve petit format « 20 »</b>	Lysis/Binding Buffer (vert)	4,6 mL	8,2 mL	11,8 mL	15,4 mL
	Proteinase K (rose)	2,2 mL	3,4 mL	4,6 mL	5,8 mL
	Magnetic Glass Particles (marron)	3,8 mL	6,2 mL	8,6 mL	11,0 mL
	Elution Buffer (jaune)*	1,8 mL	2,7 mL	3,5 mL	4,4 mL
	Wash Buffer (bleu)	5,6 mL	9,2 mL	12,8 mL	16,4 mL
<b>Cuve intermédiaire « 30 »</b>	Lysis/Binding Buffer (vert)	8,2 mL	15,4 mL	22,6 mL	29,8 mL

\* les volumes sont indiqués pour respectivement 8, 16, 24 et 32 sérums extraits, la quantité de l'Elution Buffer s'ajustant en réalité exactement au nombre d'échantillons. Par ailleurs la solution la plus économique est d'extraire 32 sérums par manipulation.

### **Préparation de l'extraction :**

Rassembler sous le PSM de la pièce N3-226 le matériel nécessaire pour une extraction :

- Bac à réactifs MagNA Pure (pris dans le MagNA Pure)
  - o 2 cuves grand format et leurs couvercles
  - o 5 cuves petit format « 20 » et leurs couvercles
  - o 1 cuve intermédiaire « 30 » et son couvercle (identique aux cuves « 20 »)
  - o Le kit d'extraction Roche « Total NA Large Volume »
  - o Une portion de « Parafilm » assez grande pour recouvrir le tout
- Une plaque 32 puits Roche et son film plastique autocollant
- Les sérums à extraire
- Le contrôle interne « Argene » pris dans le congélateur « EF 20/8 DAI3 »

### **Disposition des réactifs :**

Placer les cuves dans le bac à encoche en respectant l'ordre de la manip (deux grandes puis cinq « 20 » puis une « 30 »)

Dispatcher les réactifs selon l'ordre et les quantités relevées sur le logiciel du MagNA Pure (ou directement depuis le tableau précédent)

- Si Protéinase K à reconstituer : prendre 6,7 mL d'Elution Buffer (Jaune) et rajouter dans la poudre → attendre la dissolution complète (éviter de trop vortexer car enzyme) !!! à conserver à +4°C pendant 1 mois « max » sinon au congélateur
- Agiter les autres réactifs avant usage
- Rajouter les couvercles sur les cuves après avoir dispatché les réactifs
- Recouvrir l'ensemble de PARAFILM pour éviter la contamination par des spores aspergillaires lors du transport

### **Préparation des sérums à extraire :**

Disposer les sérums dans la plaque 32 puits :

- 995µL de sérum sont requis dans chaque puits :
  - o En cas de QI (entre 200 et 1000 µL) → compléter avec de l'Elution Buffer QSP 995 µL
  - o Si inférieur à 200µL, ce kit n'est pas le plus adapté → ne pas faire
- **Rajouter ensuite 5 µL de CI Argene dans chaque puits**
- Une fois tous les sérums disposés : recouvrir la plaque d'un film plastique autocollant (évite contamination par spore aspergillaire pendant le transport)

Ranger le contrôle interne ainsi que le restant des sérums au congélateur « EF 20/8 DAI3 » et la protéinase K au réfrigérateur « EF 4/2 DAI3 ».

Nettoyer la hotte avec du « DNA Away » et la fermer.

### **Extraction :**

Dans la pièce du MagNA Pure N3-233 :

Ouvrir le MagNA Pure et relever le « loquet »

- Placer le bac à encoches débarrassé de son PARAFILM

- Placer la cuve 32 puits contenant les sérums à extraire après lui avoir ôté (délicatement : risque d'éclaboussure et de contamination inter-puits) son film adhésif
- Placer ensuite les différents consommables tels que présentés sur l'écran et cliquer sur l'image le représentant après chaque ajout. C'est-à-dire, en plus du bac à encoche et des sérums :
  - 1 (ou plusieurs) bloc(s) de cônes bleu complet (32 cônes)
  - 1 ou plusieurs plaques de « Process »
  - « Tip stand » éventuellement
  - 2 plaques 32 puits
  - La poubelle et le « drop catcher » restant toujours en place (rien à faire en théorie sauf changer la poubelle)

Lorsque tous les réactifs et consommables sont placés, fermer le loquet, fermer le MagNA Pure et cliquer sur OK (si OK n'est pas apparu : un réactif ou consommable n'a pas été « validé »)

L'extraction se lance (30 min pour 8 puits, plus si > 8 puits)

- Une fois l'extraction terminée, l'écran affiche « Pass » sur chaque échantillon si celle-ci s'est bien déroulée.
- A la fin de l'extraction récupérer la plaque 32 puits « Elution » (au fond à droite) et placer un film adhésif dessus (protection vs spores aspergillaires)


Jeter le reste des consommables et réactifs en évitant de salir l'appareil et le sol.

Vérifier que les sérums ont bien été extraits (en regardant la plaque 32 puits de départ qui doit être totalement vide ; il ne reste normalement qu'un petit résidu jaunâtre au fond de chaque puits).

### **Post-extraction :**

Dans la salle N3-226 :

- Se placer sous la hotte de gauche
- Répartir les extraits dans les capillaires correspondant et aliquoter le reste des extraits dans des « Eppendorf » correctement identifié
- Stocker ces « Eppendorf » au congélateur « EF 20/8 DAI3 »
- Jeter la plaque 32 puits et nettoyer la hotte au « DNA Away » ainsi que le bout des pipettes utilisées

	<b>Pôle de Biologie et de Pathologie</b>  <b>Parasitologie - Mycologie</b>	PAM-PCR-MOP-XXX
	<b>PCR <i>Aspergillus</i> : préparation du mix et des capillaires</b>	
Date de diffusion : / /  Version : 1  Pages :	Rédigée par : D ROSSIGNOL  Vérifiée par :  Approuvée par :	

## Objet

Décrire les étapes de préparation du MIX (mélange réactionnel) pour la quantification de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* par LightCycler.

## Domaine d'application

Dépistage et diagnostic de l'aspergillose invasive par biologie moléculaire dans un contexte d'immunodépression. Sur 1 mL de sérum.

## Personnel

- Technicien(ne)s

## Matériels et réactifs

- Capillaires et leurs bouchons
- Bloc froid porte-capillaires
- Bloc froid pour Eppendorf
- Hotte dédiée
- Pipettes 10, 20, 100 et 200 µL et leurs cônes
- Amorces sens et anti-sens diluées à 10 µM (cible *Aspergillus*)
- Amorces sens et anti-sens diluées à 10 µM (cible contrôle interne)
- Sonde *Aspergillus* diluée à 4 µM
- Sonde contrôle interne diluée à 4 µM
- Kit Roche DNA « FastStart Hybprobe Master »
- Point de gamme 10<sup>4</sup> copies/µL
- Extraits de sérums



## Contenu

### Calcul des quantités nécessaires au mix :

- Ouvrir le fichier Excel « Mix.xls »
- Ajuster le nombre de capillaires+1 à la manip (pour 9 capillaires prévus, en préparer pour 10) et désigner clairement les capillaires (contenu et position) sous le tableau de mix, ceci faisant office de référence pour tout le reste de la manip
- Imprimer le mix qui servira tout au long de la PCR

### Préparation du mix dans la pièce N3-227 :

- Mettre un sarreau et une charlotte
- Sortir la boîte « Solutions fille » du congélateur « EF 20/9 DAI3 », elle contient :
  - Les réactifs « maison » :
    - les amorces diluées (à 10  $\mu$ M)
      - Asp sens et antisens
      - CI sens et antisens
    - les sondes diluées (4 $\mu$ M)
      - Asp
      - CI
  - Les réactifs issus du kit Roche « DNA Master HybProbe » :
    - le mix Taq + dNTP (1),
    - le MgCl<sub>2</sub> (2)
    - l'eau (3)
  - Décongeler l'ensemble, vortexer (sauf la Taq +++) et centrifuger
- Sortir également le porte-capillaire marqué « parasito » du réfrigérateur « EF 4/3 DAI3 » ainsi que des capillaires marqués « parasito » du même endroit. Si plus de capillaire, en prendre dans le sas (en haut de l'armoire dans une grande boîte en carton)
- Placer les capillaires sur le porte-capillaire en fonction du nombre prévu dans la manipulation
- Réaliser le mix sous la hotte en additionnant les réactifs de bas en haut (de la feuille) (vortexer/centrifuger juste avant de mettre le réactif (1) puis rajouter le (1) et homogénéiser par flush et centrifuger)
- Répartir le mix proprement (étape importante) soit 15 $\mu$ L dans chaque capillaire.

- Vérifier qu'il reste environ 15 µL dans l'éppendorf du mix
- Fermer le porte-capillaire à l'aide de son couvercle, ranger la boîte « Solutions fille », nettoyer la hotte et les pipettes au DNA Away, fermer la hotte et mettre les UV (pousser l'interrupteur en arrière et tourner le « chronomètre »).


### **Répartition des ADN en salle N3-226 :**

- passer en pièce N3-226 (garder son sarreau)
- Sortir le point de gamme 10<sup>4</sup>, décongeler, vortexer et centrifuger
- se mettre sous la hotte du fond à gauche où vous retrouvez la plaque 32 puits contenant les extraits
- rajouter les extraits au mix soit 5µL d'extrait par puits → point très important, ajouter lentement, sans se tromper de puits, faire quelques aller-retours afin de bien vider son cône ; ajouter de même le point de gamme.
- Boucher les capillaires à l'aide du stylo « LightCycler » et des bouchons (premier tiroir meuble à droite du congélateur)
- Ranger les extraits au congélateur
- Remplacer le couvercle du porte-capillaire sans forcer (il ne ferme pas quand il y a les bouchons : risque de les briser).

### **Guide de reconstitution des amorces et sondes diluées ainsi que le solution (1) :**

- Si plus d'amorces diluées ou de sondes diluées :
  - Ouvrir la boîte « Solutions mère » où se situent des aliquots dilués (prêts à l'emploi, juste décongeler, vortexer, centrifuger)
- Si plus d'aliquot : décongeler la ou les solutions mères requises (bien identifiées → amorces Asp N S et AS, amorces CI N S et AS, sonde ASP, sonde CI N) et diluer de la manière suivante :
  - Pour les amorces : 10 µL de solution mère d'amorce dans 90 µL d'eau pour PCR (réactif (3) du kit, de préférence un nouveau flacon pour éviter les contaminations)
  - Pour les sondes : 2 µL de solution mère de sonde dans 48 µL d'eau pour PCR
- Si plus de réactif (1), reconstituer à partir du kit soit 60 µL de 1b (décongelé, vortexé, centrifugé) dans un flacon de 1a (préalablement centrifugé) ; homogénéiser par flush

NB : les kits sont dans le congélateur, tiroir du bas, noté « PCR Asp » (DNA Master HybProbe de Roche, boîte bleue)

	<b>Pôle de Biologie et de Pathologie</b>  <b>Parasitologie - Mycologie</b>	PAM-PCR-MOP-XXX
	<b>PCR <i>Aspergillus</i> : utilisation du Light Cycler</b>	
Date de diffusion : / /  Version : 1  Pages :	Rédigée par : D ROSSIGNOL  Vérifiée par :  Approuvée par :	

## Objet

Utiliser le logiciel Light Cycler Software 4.05 dans le cadre d'une PCR *Aspergillus fumigatus* quantitative.

## Domaine d'application

Diagnostic par PCR quantitative de l'aspergillose invasive.

## Personnel

- Technicien(ne)s

## Matériels et réactifs

- Centrifugeuse Light Cycler
- Light Cycler
- Ordinateur
- Light Cycler Software 4.05
- Imprimante

## Contenu

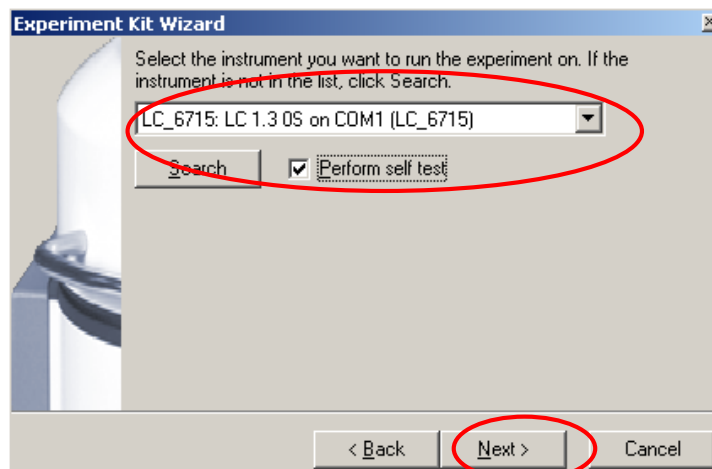
# Préparation du run

### **Paramétrage informatique :**

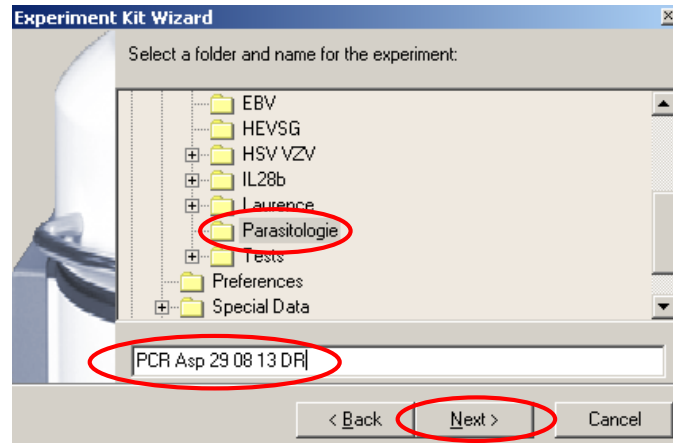
- Aller en pièce N3-230, se placer sur l'ordinateur adossé au LightCycler utilisé
- Démarrer le logiciel « LightCycler Software 4.1 »
- Sur l'écran principal : choisir le macro dans la liste des macros proposés → « A. fumigatus : macro final »
- Si l'écran principal n'affiche pas de liste de macro cliquez sur « Run Macro » puis choisissez « A. fumigatus : macro final »
- Une fenêtre s'ouvre, cliquer sur « Next »



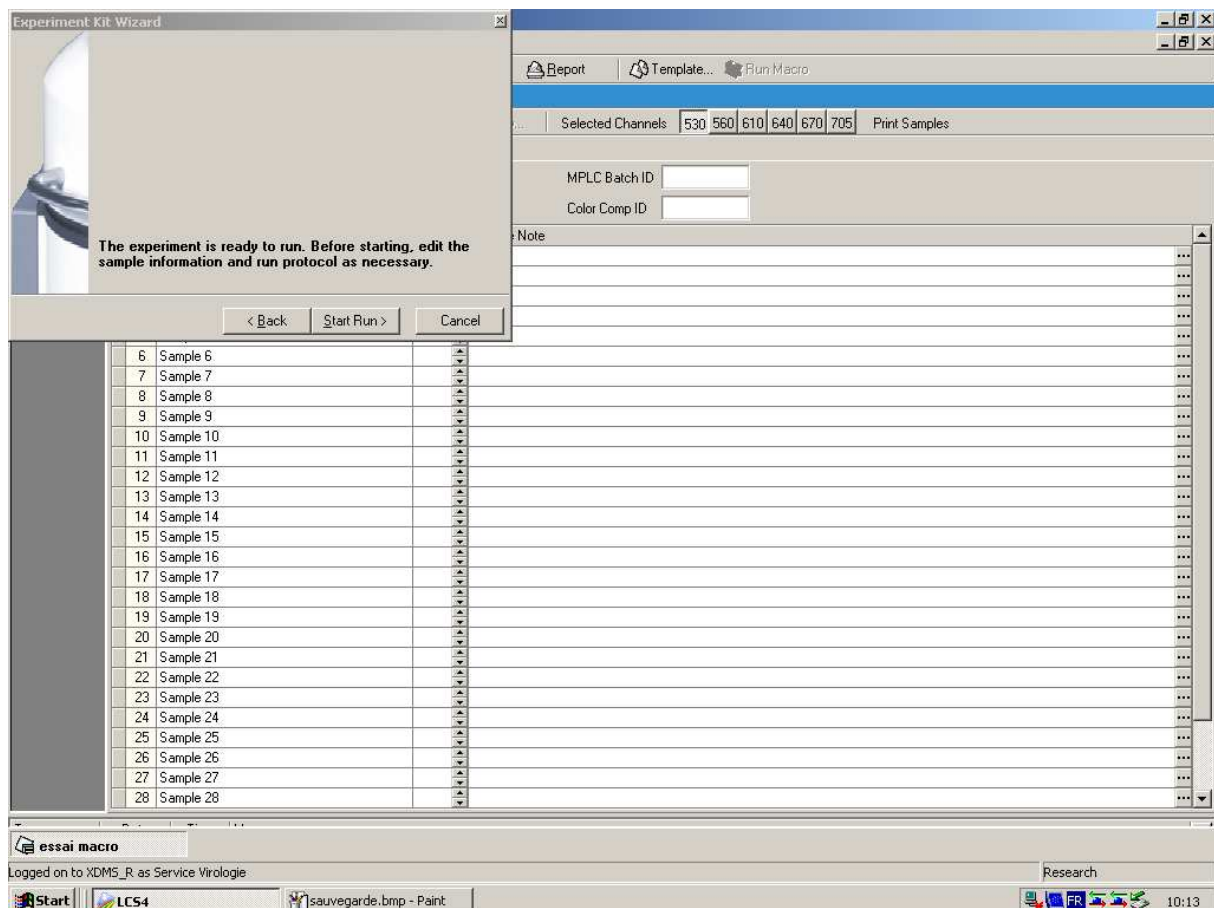
- L'ordinateur vous propose de choisir le LightCycler à utiliser : vérifier que celui-ci est allumé
- Cochez « Perform self test » (l'appareil réalise son auto-test afin de vérifier que l'ensemble de ses fonctions soient utilisables) puis cliquer sur « Next »



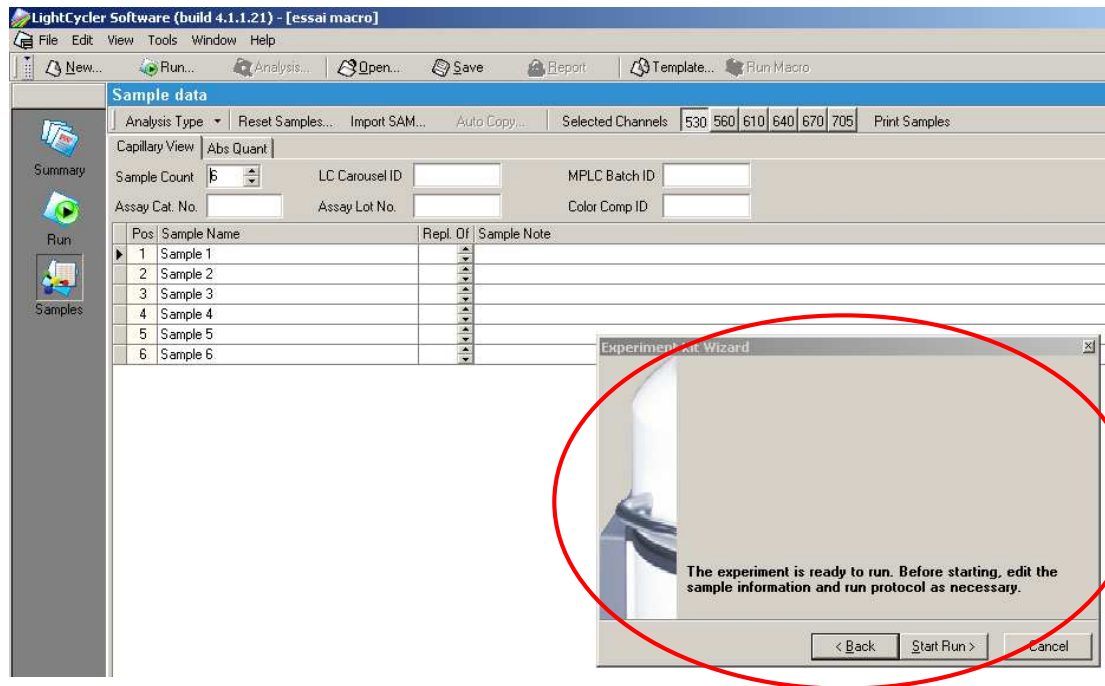
- Sauvegarder l'expérience en se plaçant dans le dossier « Experiments » puis « Parasitologie ». Identifiez clairement le fichier, par exemple : « PCR Asp + date + initiales utilisateur »



- Vous arrivez à cet écran



- Déplacer la fenêtre « Experiment Kit Wizard » afin de pouvoir paramétrer l'expérience



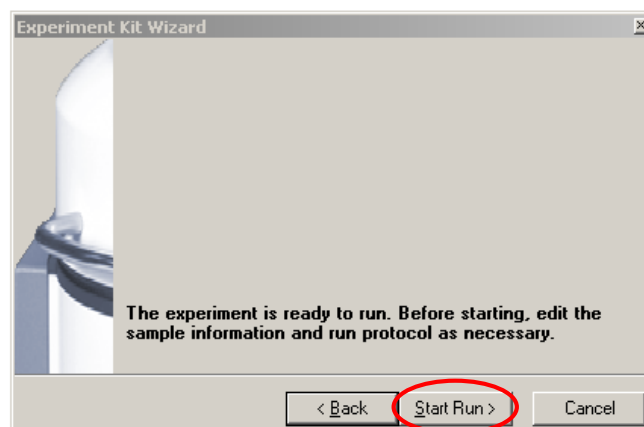
- Dans l'onglet « Capillary View », ajuster le nombre de capillaires de l'expérience à l'aide de la case « Sample Count »
- **L'échantillon en position 1 est toujours le point de gamme  $10^4$  (déjà paramétré) et l'échantillon en position 2 est toujours le témoin négatif (déjà paramétré).**

### **Préparation du carrousel :**

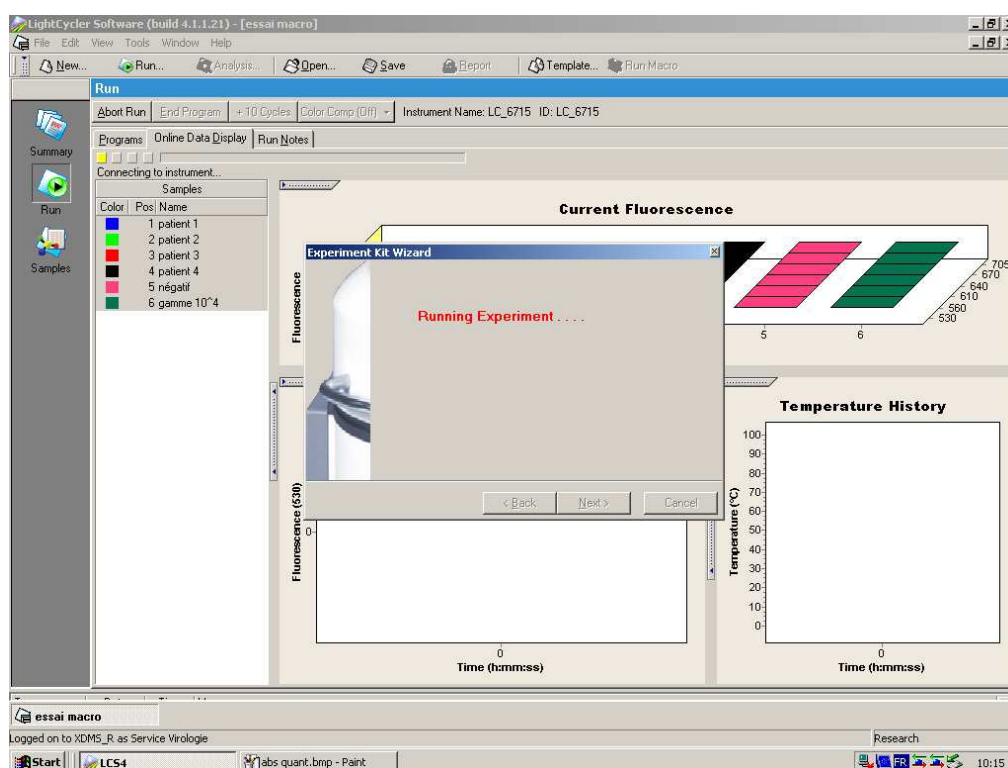
- Placer délicatement les capillaires dans le carrousel en respectant l'ordre de l'expérience
- Centrifuger les capillaires en plaçant le carrousel sur le porte carrousel « Roche » (durée : 15 sec)
- Contrôle visuel du remplissage des capillaires (en regardant par-dessous le carrousel : les niveaux doivent être équivalents)
- Placer le carrousel dans le LightCycler en le « clipsant » bien

### **Lancement du run :**

- Cliquez sur « Start Run »
- Durée du run : 1h20



Voici l'écran qui apparaît durant le déroulement du run



## Post-run

L'analyse se fait automatiquement sur la base de templates d'analyse préalablement créés et intégrés au programme.

**Export en PDF/Impression pour validation par le biologiste :**

- Cliquer sur « Save » puis sur « Report »




- Cocher toutes les cases dans la colonne de gauche puis imprimer dans PDF Creator
- Imprimer le PDF ensuite pour validation biologique

### **Nettoyage :**

- Jeter les capillaires en les sortant du carrousel à l'aide du socle adapté
- Placer les capillaires dans un sachet en plastique, le sceller et l'éliminer dans la poubelle en plastique jaune
- Remplacer le carrousel sur le LightCycler, puis selon l'horaire de la journée, éteindre le LightCycler



**Annexe 3 :** procédure de validation biologique de la PCR *A. fumigatus*

	<b>Pôle de Biologie et de Pathologie</b>  <b>Parasitologie - Mycologie</b>	PAM-PCR-MOP-XXX
	<b>PCR <i>Aspergillus fumigatus</i> : interprétation de la quantification et rendu des résultats</b>	
Date de diffusion : 23/10/13		Rédigée par : M. CORNET
Version : 1		Vérifiée par : D. ROSSIGNOL
Pages : 4 (annexe 1)		Approuvée par : H. FRICKER-HIDALGO

**Object**

Fournir des règles d'interprétation des résultats de la PCR quantitative en temps réel par LightCycler pour le diagnostic de l'Aspergillose invasive.

**Domaine d'application**

Rendu des résultats de la PCR quantitative en temps réel par LightCycler

Diagnostic par PCR quantitative de l'Aspergillose invasive.

**Personnel**

- Technicien(ne)s, internes, biologistes.

**Matériels et réactifs**

- Light Cycler Software 4.05

- Imprimante

**Contenu**

Avant toute interprétation vérifier les paramètres suivants : contrôle interne positif dans tous les capillaires, gamme étalon (1 point)= témoin positif, correct, témoin négatif (Elution Buffer) non détecté,

Pour le démarrage et l'analyse de la PCR sur Lightcycler voir PAM-COP-MOP-XXX

Etape1 : interprétation de la quantification et rendu des résultats

Le rendu de la quantification devra se faire par mL de prélèvement (Sérum). Le volume standard étant 1 ml **ne noter sur le tableau le vol Vi que quand il est différent de 1 ml** qui sera traité pour l'extraction de l'ADN.

Le nombre de copies du gène 28S de *A. fumigatus* donné par le Lightcycler (Colonne concentration du tableau du Lightcycler ) est celui quantifié dans le capillaire donc dans 5 µL

Pour trouver le nombre de copies de 28S de *A. fumigatus* dans les 50 µL du volume d'élution (**Ve**) nous multiplions par **50**. Pour obtenir ce nombre par mL de prélèvement: il faut diviser par le **vol** en mL.

**Copies 28S de *A. fumigatus* / ml de sérum) = concentration du tableau du LC × 50 / Vi (mL)**

## Exemples

	Quantité initiale en mL	Extraction ADN volume d'élution en µL (Ve)	Prise d'essai pour PCR en µL	concentration quantifiée par le LC par µl de Mix	Rendu en copies de 28S de <i>A. fumigatus</i> par ml de prélèvement
Sérum	1 mL	50 µL	5 µL	5.5 E1	$5.5 \text{ E1 copies} \times 5 \times (50\mu\text{l}/5 \mu\text{l}) / 1 \text{ mL} = 5.5 \text{ E1} \times 50 = 2750 \text{ copies /ml}$
Sérum	400 µl	50 µL	5 µL	5.5 E1	$5.5 \text{ E1 copies} \times 5 \times (50\mu\text{l}/5 \mu\text{l}) / 0.4 \text{ mL} = 5.5 \text{ E1} \times 50 / 0.4 = 6875 \text{ copies /ml}$
Sérum	200 µl	20 µl	5 µl	5.5 E1	$5.5 \text{ E1 copies} \times 5 \times (20\mu\text{l}/5 \mu\text{l}) / 0.2 \text{ mL} = 5.5 \text{ E1} \times 20 / 0.4 = 5500 \text{ copies/ml}$

S'aider du fichier excel "calcul charge fongique" pour faire les calculs avec la formule automatique

Quelque soit la quantification du nombre de copies le résultat est considéré comme positif

Tout résultat positif doit être téléphoné et discuté avec le prescripteur.



Saisie du résultat sur Synergie



WSE saisie FT personnalisée. Appeler la FT préalablement constituée (sinon la constituer à ce moment-là WSC constitution FT personnalisée).



Rendu en colonne des différents paramètres

Gène 28S	Cp value	Charge value	Contrôle interne	Conclusion
P positif N négatif	> 45 si négatif ou valeur si positif	0 ou charge calculée	AIA : absence d'inhibiteur  PIA: présence d'inhibiteur	texte codé (à choisir parmi les codes

Sauver



OK



Puis aller valider en validation VAL dans Synergie



Appeler le secteur PCR. F12 sur analyse.

Diffusion	Laboratoire de Parasitologie-Mycologie	
Classement	Dans le classeur jaune «PCR»	
Rédaction	M. CORNET	23/10/13
Vérification	D. ROSSIGNOL	
Vérification qualité	H. FRICKER-HIDALGO	
Approbation	H. FRICKER-HIDALGO	
Historique		



# Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».